

Kartlegging av metabolismen til *N*-dealkylquetiapin *in vitro*

Karoline Knutsen



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITET I OSLO

Desember 2010

Kartlegging av metabolismen til *N*-dealkylquetiapin *in vitro*

Karoline Knutsen



Masteroppgaven ble utført ved avdeling for farmasøytisk
biovitenskap,

Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo og ved
Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet Sykehus

Veiledere:

Professor Espen Molden

Stipendiat Gry Vibeke Bakken

Forord

Denne oppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og Senter for Psykofarmakologi under veiledning av professor Espen Molden og stipendiat Gry Vibeke Bakken. Arbeidet ble påbegynt august 2009 og avsluttet november 2010.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til Espen Molden og Gry Vibeke Bakken for god oppfølging og veiledning under arbeidet med masteroppgaven. Espen, du er en glimrende veileder med et svært inspirerende og motiverende engasjement. Tusen takk for at du alltid har tatt deg tid og gitt støtte under skriveprosessen. Gry Vibeke, tusen takk for god opplæring, hyggelige samtaler og oppmuntring gjennom hele perioden.

Jeg vil også takke alle ansatte ved psykofarmakologisk avdeling som har bidratt ved gjennomføringen av dette prosjektet.

En spesiell takk til Niclas, Lene og Undis ved psykofarmakologisk avdeling som har vært behjelpelige og gitt meg god opplæring på analyseinstrumentet.

I tillegg vil jeg takke Hege Christensen for gode samtaler, faglig innspill og smittende humør.

Tusen takk til mine gode medstudenter og venninner, Irene, Hilde, Jeanette og Irene. Det har vært noen morsomme, tøffe, uforglemmelige og opplevelserike år, som ikke hadde blitt det samme uten dere.

Jeg vil takke familie og venner for oppmuntrende ord og støtte underveis. Sist, men ikke minst, vil jeg takke min mann Einar Lømo for korrekturlesing, tålmodighet, interesse og forståelse. Du har vært fantastisk gjennom hele studietiden min.

Oslo, november 2010

Karoline Knutsen

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD.....	3
FORKORTELSER.....	7
SAMMENDRAG.....	8
1 INNLEDNING.....	10
1.1 Metabolisme	10
1.2 Cytokrom P450 systemet.....	10
1.2.1 CYP3A-subfamilien og isoenzymet CYP3A4	13
1.2.2 CYP2-familien og isoenzymet CYP2D6.....	14
1.3 Enzymkinetikk.....	15
1.3.1 Michaelis-Menten-kinetikk	15
1.3.2 Atypisk kinetikk	17
1.3.3 Beregning av CL_{int} <i>in vitro</i>	18
1.4 <i>In vitro</i> -modeller for metabolismestudier.....	20
1.5 Identifikasjon og strukturbestemmelse av ukjente forbindelser	22
1.6 Quetiapin	24
1.7 <i>N</i> -dealkylquetiapin.....	25
1.8 Hensikt.....	27
2 MATERIALER OG METODER	28
2.1 Utstyr	28
2.2 Analytter, mikrosomer og kjemikalier.....	29
2.3 Løsninger	31
2.4 Generell inkubasjonsprosedyre.....	32
2.5 LC-MS analyse	33
2.6 Forsøk med HLM	35
2.6.1 Påvisning, identifikasjon og strukturbestemmelse av metabolitter	35
2.6.2 Metabolisme av <i>N</i> -dealkylquetiapin som funksjon av tid.....	36
2.6.3 Metabolisme av <i>N</i> -dealkylquetiapin som funksjon av enzymkonsentrasjon	37
2.6.4 Metabolisme av <i>N</i> -dealkylquetiapin som funksjon av substratkonsentrasjon	37
2.6.5 Metabolittdannelse etter ko-inkubasjon med CYP-hemmere	37
2.7 Forsøk med rekombinante insektsmikrosomer.....	38
2.7.1 Substrattap.....	38

3	RESULTATER	40
3.1	Forsøk med HLM	40
3.1.1	Identifikasjon av metabolitter.....	40
3.1.2	Strukturbestemmelse av metabolitter	41
3.1.3	Metabolisme av <i>N</i> -dealkylquetiapin som funksjon av tid.....	43
3.1.4	Metabolisme av <i>N</i> -dealkylquetiapin som funksjon av enzymkonsentrasjon	44
3.1.5	Metabolisme av <i>N</i> -dealkylquetiapin som funksjon av substratkonsentrasjon ...	45
3.1.6	Relativ metabolittdannelse etter ko-inkubasjon med CYP-hemmere	47
3.2	Forsøk med rekombinante insektsmikrosomer.....	49
3.2.1	Substrattap.....	49
3.2.2	Relativ metabolittdannelse	50
4	DISKUSJON	52
4.1	Metabolittdannelse via CYP2D6 og CYP3A4	52
4.2	Relativ betydning av CYP2D6 og CYP3A4.....	54
5	KONKLUSJON	58
	LITTERATURLISTE	59

FORKORTELSER

b_5	Cytokrom b_5
CL_{int}	Clearance intrinsic
CYP	Cytokrom P450
C18	Hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer
e_0	Enzymkonsentrasjon
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
ESI	Elektrospray ionisasjon
FDA	Food and Drug Administration
H_2SO_4	Svovelsyre
HLM	Humane levermikrosomer
k_{cat}	Katalytisk konstant for dannelse av produkt
K_m	Michaelis-Menten-konstanten, substratkonsentrasjon som gir halvparten av V_{max}
LC-MS/MS	Væskeskromatografi-massespektrometri
MeOH	Metanol
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MS	Massespektrometri
MS/MS	Tandem-MS
MS1	Kvadropol 1
MS2	Kvadropol 2
m/z	Masse til ladningsforhold
MX_1	Uidentifisert metabolitt 1 (metabolitt av <i>N</i> -dealkylquetiapin)
MX_2	Uidentifisert metabolitt 2 (metabolitt av <i>N</i> -dealkylquetiapin)
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMR	Kjernemagnetisk resonans (nuclear magnetic resonance)
S_{50}	Substratkonsentrasjonen som gir halve V_{max}

SM	Sulfoksid-metabolitt (metabolitt av <i>N</i> -dealkylquetiapin)
V_d	Distribusjonsvolum
V_{\max}	Maksimal reaksjonshastighet for et enzym
7HM	7-hydroksy-metabolitt (metabolitt av <i>N</i> -dealkylquetiapin)

SAMMENDRAG

Bakgrunn: Quetiapin er et antipsykotisk legemiddel som hovedsakelig metaboliseres av CYP3A4 og i noe grad av CYP2D6. I dag er det så vidt kjent ingen publiserte studier som har undersøkt metabolismen av *N*-dealkylquetiapin, til tross for at metabolitten er involvert i den antidepressive effekten til quetiapin. Hensikten med denne *in vitro*-studien var derfor å kartlegge metabolismen av *N*-dealkylquetiapin og å bestemme om, og eventuelt i hvilken grad CYP3A4 og/eller CYP2D6 er involvert i omsetningen av denne metabolitten.

Metoder: Påvisning, identifikasjon og strukturbestemmelse av metabolitter dannet etter inkubasjon av *N*-dealkylquetiapin med HLM ble utført ved bruk av LC-MS/MS-analyser. Singel MS-scan ble benyttet for å finne mulige metabolitter av *N*-dealkylquetiapin, mens ulike tandem MS-metoder ble benyttet for å identifisere og strukturbestemme metabolittene. Videre ble affinitetskonstanter (K_m/S_{50} -verdier) for de ulike metabolittene av *N*-dealkylquetiapin estimert ved måling av dannelseshastighet av metabolitter ved økende konsentrasjoner av *N*-dealkylquetiapin (1-1000 μ M), etter inkubasjon med HLM. For å undersøke om CYP2D6 og/eller CYP3A4 var involvert i metabolismen av *N*-dealkylquetiapin ble metabolittdannelsen sammenlignet før og etter ko-inkubasjon med CYP2D6-hemmer (kinidin) og CYP3A4-hemmer (ketokonazol) i HLM. I tillegg ble den relative dannelsen av metabolitter fra *N*-dealkylquetiapin undersøkt etter inkubasjon med rekombinante CYP2D6- og CYP3A4-insektmikrosomer med spesifikt enzymuttrykk. Her ble også forbruk (tap) av *N*-dealkylquetiapin målt som funksjon av tid i tidsintervallet 0-60 minutter, for å estimere clearance intrinsic (CL_{int}) av *N*-dealkylquetiapin via de respektive enzymene.

Resultater: Fra forsøk med HLM uten hemmere ble det identifisert fire kromatografiske ”topper” som sannsynligvis representerte metabolitter av *N*-dealkylquetiapin. Etter tolkning av MS/MS-spekterene til metabolittene ble to metabolitter strukturbestemt til henholdsvis 7-hydroksy-metabolitt (7HM) og sulfoksid-metabolitt (SM), mens de resterende to metabolittene ikke lot seg med sikkerhet identifisere (angitt som MX_1 og MX_2). De laveste K_m/S_{50} -verdiene i HLM-forsøkene ble estimert for dannelsen av 7HM og SM, og disse ble antatt å være hovedmetabolittene av *N*-dealkylquetiapin *in vitro*. HLM-forsøk med CYP2D6- og CYP3A4-hemmere viste at dannelsen av 7HM ble redusert med ca 90 % ved tilsetning av

CYP2D6-hemmeren kinidin, mens dannelsen av SM og MX₁ ble redusert med ca 75 % ved tilsetning av CYP3A4-hemmeren ketokonazol. Dannelsen av MX₂ ble redusert mest med ketokonazol (ca 45 %). Forsøk med rekombinante CYP2D6- og CYP3A4-insektmikrosomer med substrattapmetoden viste at CL_{int} via CYP2D6 var om lag 6 ganger større sammenlignet med CL_{int} via CYP3A4. Den relative dannelsen av metabolitter etter inkubasjon av *N*-dealkylquetiapin med insektmikrosomene viste at 7HM ble nesten utelukkende dannet via CYP2D6, mens dannelsen av de andre metabolittene var høyest via CYP3A4.

Diskusjon og konklusjon: Denne oppgaven har dokumentert at både CYP3A4 og CYP2D6 er involvert i metabolismen av *N*-dealkylquetiapin *in vitro*. Videre ble det påvist at CYP2D6 er viktig for dannelsen av 7HM, mens CYP3A4 er viktig for dannelsen av SM og de uidentifiserte metabolittene MX₁ og MX₂. Individuell variasjon i fenotype av disse enzymene, som følge av genetiske forhold eller interaksjoner, vil derfor potensielt kunne få kliniske konsekvenser ved behandling med quetiapin i form av ulik serumkonsentrasjon og antidepressiv respons av den aktive metabolitten *N*-dealkylquetiapin. I hvilken grad genetisk variasjon eller interaksjoner vil innvirke på serumkonsentrasjonen av *N*-dealkylquetiapin, og eventuell respons av quetiapin-behandling, må midlertidig undersøkes nærmere i *in vivo*-studier.

1 INNLEDNING

1.1 Metabolisme

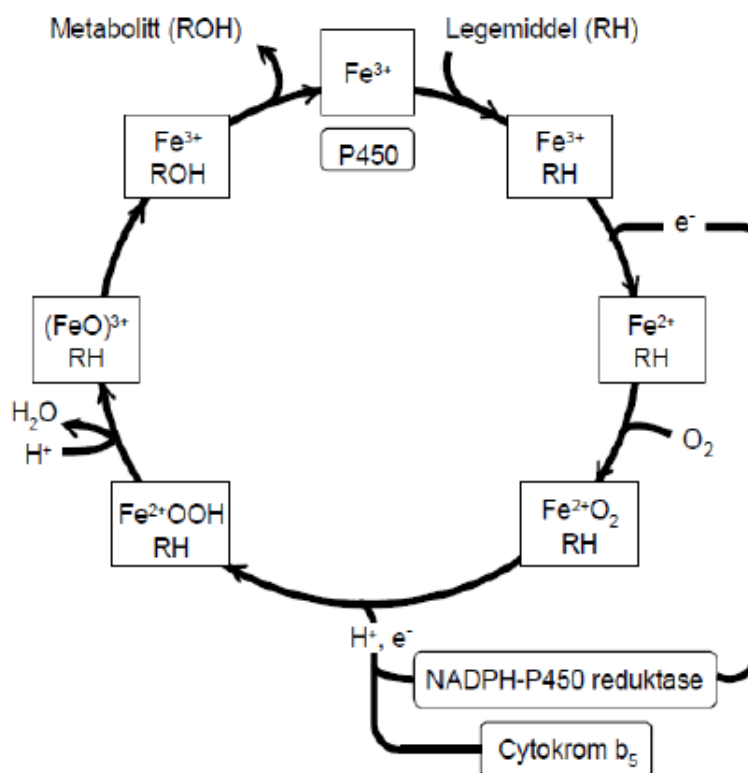
Metabolisme er en biokjemisk omdannelsesprosess som naturlig forekommer i kroppen. Den har til hensikt å fjerne fremmede stoffer (xenobiotika), ved å gjøre de mer vannløslige slik at de lettere skilles ut via urin eller galle. Mennesker blir stort sett utsatt for xenobiotika gjennom mat, drikke, kosmetikk, forurensninger, tilsetningsstoffer og ikke minst legemidler. Metabolisme av xenobiotika skjer primært i lever, som består av hele 90 % metaboliserende celler (hepatocytter) [1]. Legemidler og andre xenobiotika blir som oftest omdannet til mer polare og inaktive stoffer i lever via to type biokjemiske reaksjoner: fase I- og fase II-reaksjoner [2]. Fase I-metabolisme er katabolske reaksjoner, der det adderes funksjonelle grupper (alkohol, fenol, karboksylsyre) som modifiserer substratet, men løseligheten vil nødvendigvis ikke påvirkes [1]. Reaksjonene involverer både oksidasjon, reduksjon og hydrolyse. Det er de oksidative prosessene som dominerer og metabolittene er ofte inaktive stoffer, men kan i noen tilfeller være vesentlig mer aktive enn modersubstans (såkalte prodrugs). Fase II-metabolisme er anabolske reaksjoner som involverer konjugering av kroppsegne stoffer til substratet. I mange tilfeller skjer konjugeringen på funksjonelle grupper i molekylet som er dannet etter fase I-metabolisme. Reaksjonen vil danne metabolitter med høyere molekylvekt som normalt er mer polare enn substratet. Det er flere konjugerende enzymer som er involvert i fase II-reaksjonen, blant annet glutathion-S-transferase (GST) og UDP-glukoronosyltransferase (UGT) [1]. Begge fasene har til hensikt å øke hydrofilisiteten og renal eliminasjon [1, 2].

1.2 Cytokrom P450 systemet

Fase I-metabolisme drives hovedsakelig av cytokrom P450 (CYP)-systemet, som har fått sitt navn på grunn av at disse enzymene når de er bundet til karbonmonoksid, ble vist å ha maksimum ("peak") absorpsjon ved 450 nm bølgelengde [3, 4]. CYP-enzymene er meget sentrale i metabolismen av legemidler og andre xenobiotika, men flere er også involvert i omsetning og modifisering av endogene stoffer, som blant annet fettsyrer, steroidhormoner og prostaglandiner [3, 5]. Enzymene er lokalisert i celler der de er bundet til membraner i

endoplasmatisk retikulum [1]. De aller fleste vev uttrykker CYP-enzymmer til en viss grad, men de finnes hovedsakelig i hepatocytene og enterocytter (høyest uttrykk i førstnevnte) [6].

CYP-superfamilien deles inn i familier (40 % likhet i sekvensidentiteten), subfamilier (55 % eller mer likhet i sekvensidentiteten) og spesifikke isoenzymer (97 % likhet i sekvensidentiteten). Enzymene blir navngitt og klassifisert etter aminosyresekvens [1, 7]. CYP er fellesbetegnelsen for superfamilien, mens det første tallet i navnet beskriver type familie (f.eks CYP1, og CYP2), deretter beskriver bokstaven type subfamilie (f.eks CYP2C, og CYP2D). Det siste tallet beskriver den spesifikke CYP-isoformen (f.eks CYP2C19, og CYP2C9) [7]. Det er i dag identifisert 57 ulike gener som koder for humane CYP-isoenzymer [6] og 18 humane CYP-familier [3]. Av de 18 CYP-familiene er det tre familier (CYP1, CYP2 og CYP3) som i all hovedsak er involvert i oksidasjon av legemidler [3, 6, 8]. Oksidasjonen av legemidler via cytokrom P450 krever molekylært oksygen (O_2), NADPH og et flavoprotein (NADPH-P450-reduktase) for å katalysere reaksjonen [4]. I tillegg er det vist at cytokrom b_5 også er en viktig faktor som kan øke den katalytiske hastigheten [9]. Det er jernatomet i CYP-enzymene som binder oksygen i det aktive setet til CYP-enzymet. Mekanismen er en del av den komplekse syklusen vist i figur 1.



Figur 1: Katalytisk syklus for cytokrom P450 enzymene. Overføringen av elektronene (e⁻) skjer via NADPH-cytokrom-P450-reduktase, alternativt cytokrom b₅. Syklusen resulterer i frigjøring av en oksidert metabolitt (ROH) og et regenerert cytokrom P450 enzym [2].

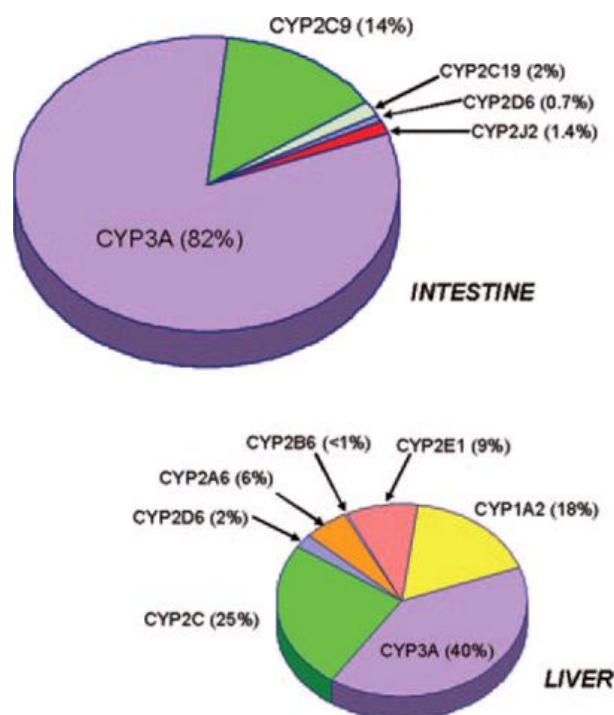
Oppsummert resulterer syklusen i at et oksygenatom adderes til legemiddelet, vann dannes og cytokrom P450 enzymet regenereres. Likning 1 viser en generell formel for CYP-oksidasjon:

$$R-H + O_2 + NAD(P)H + H^+ \rightarrow R-O-H + H_2O + NAD(P)^+$$

De fleste CYP-enzymene har stor bindingskapasitet og har derfor evne til å metabolisere et stort antall ulike strukturer. Ulike CYP-enzymene har i tillegg ofte overlappende substratspesifisitet, der flere enzymer kan katalysere metabolismen av det samme substratet. Uttrykk CYP-enzymene varierer betydelig mellom individer, noe som kan skyldes genetiske forhold og miljøfaktorer, (f. eks. kosthold, rusmiddeleksponering, hormonregulering eller legemiddelinteraksjoner). [1, 5, 8].

1.2.1 CYP3A-subfamilien og isoenzymet CYP3A4

CYP3A-subfamilien anses som den viktigste underfamilien i cytokrom P450 systemet, både på grunn av dens utbredelse i tarm og lever, og grad av involvering i metabolismen av legemidler. Av totalt protein innhold i lever representerer CYP3A 30-40 % og tilsvarende 80 % i tarm (figur 2) [10]. CYP3A-familiene metaboliserer ca 50 % av markedsførte legemidler i dag [1]. CYP3A-enzymenes evne til å metabolisere såpass mange forskjellige substrater tilskrives et stort aktiv sete med mulighet for å binde strukturelt ulike forbindelser [11, 12]. Genet til CYP3A-subfamilien er lokalisert mellom kromosom 7q22 og 7qter [13], og koder for fire gener som i dag har gitt opphav til de fire identifiserte isoenzymene, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43. Både isoenzymet CYP3A43 og CYP3A7 anses i liten grad å være involvert i metabolismen av legemidler til tross for at begge finnes i lever. CYP3A7 er hovedsakelig uttrykt i lever hos foster, men i liten grad hos voksne [14]. CYP3A43 er det siste identifiserte enzymet i subfamilien. Enzymet finnes i lever hos både foster og voksne, men den katalytiske aktiviteten sammenlignet med CYP3A4 er lav [12].



Figur 2: Gjennomsnittlig prosentvis fordeling av CYP-enzymene i lever og tarm. Av totalt CYP-innhold i tarm er bidraget av CYP3A over 80 %, mens det i lever er 40 % [10].

Av de fire isoenzymene regnes CYP3A4 som det viktigste og dominerende enzymet i lever og tarm hos de aller fleste voksne. Det er til nå funnet 40 ulike allelvarianter av genet som koder for CYP3A4 [15], men ingen av disse har foreløpig vist seg å forklare den store variasjonen som er observert i enzymaktivitet av CYP3A4 [12, 16]. De store interindividuelle variasjonene relatert til enzymet kan derfor tilskrives miljøfaktorer og legemiddelinteraksjoner ved inntak av indukere og hemmere av CYP3A4, mens genetisk variasjon anses derimot å ikke være av stor betydning.

1.2.2 CYP2-familien og isoenzymet CYP2D6

CYP2-familien er den største familien i cytokrom P450-systemet hos mennesker i form av antall ulike isoenzymer [3]. Isoenzymet CYP2D6 er involvert i metabolismen av flest legemidler innen CYP2-familien, men utgjør kun en liten andel (1-2 %) av totalt CYP-innhold i lever (figur 2) [10]. CYP2D6 metaboliserer 25 % av legemidlene på markedet i dag [17], og det er typisk store lipofile baser som er substrater for CYP2D6, blant annet mange antidepressiva og antipsykotika [16, 18]. Subfamilien CYP2D er lokalisert på kromosom 22 og det finnes i alt 3 gener i familien, men det er kun CYP2D6 som er aktivt gen [19]. Det er identifisert over 80 mutante alleler for CYP2D6-isoenzymet og flere av disse mutasjonene er assosiert med endret enzymaktivitet [15, 19]. Genetisk variabilitet er derfor en dominerende faktor ved variasjon i aktivitet av CYP2D6-enzymet. De ulike allelene til CYP2D6 kan resultere i alt fra fraværende, nedsatt, uendret eller økt enzymaktivitet [17]. En populasjon kan på bakgrunn av dette deles inn i fire undergrupper avhengig av CYP2D6-genotype.

I kaukasisk befolkning er 3-5 % CYP2D6 "ultrarapid metabolizers" (UMs), også kalt ultrasnask omsettere [17], som skyldes nedarving av multipliserte (ofte dupliserte) aktive alleler. Den økte metabolske aktiviteten medfører økt dosebehov av mange legemidler for å oppnå terapeutisk effekt. Individer som derimot er homozygote for alleler med fraværende enzymaktivitet regnes som "poor metabolizers" (PMs), trege omsettere [19, 20]. Det er beskrevet ca 20 ulike variantalleler som koder for fraværende enzymaktivitet [21], der *3, *4, *5 og *6 er de mest hyppige [17]. Om lag 5-10 % av den kaukasiske befolkningen er CYP2D6 PMs [17], de har ingen aktive alleler og produserer ikke aktivt enzym. Dette kan resultere i høyere risiko for bivirkninger og lavere dosebehov for mange legemidler for å få en

optimal effekt. Såkalte "extensive metabolizers" (EMs) har ingen mutasjoner i genet som koder for CYP2D6. I den kaukasiske befolkningen er det 50-60 % som er CYP2D6 EMs [17]. Den siste blant de fire sentrale undergruppene er de som er heterozygote EMs, med et aktivt (villtype *1 eller aktivt variant allel *2) allel [19], og et allel med defekt aktivitet. Hos denne undergruppen (HEMs) vil enzymaktiviteten være noe lavere enn EMs [17]. Et viktig poeng er at fordelingen av disse undergruppene varierer mellom ulike populasjoner, eksempelvis PMs som representerer 5-10 % av den kaukasiske befolkningen mot mindre enn 2 % i den kinesiske befolkningen.[19].

1.3 Enzymkinetikk

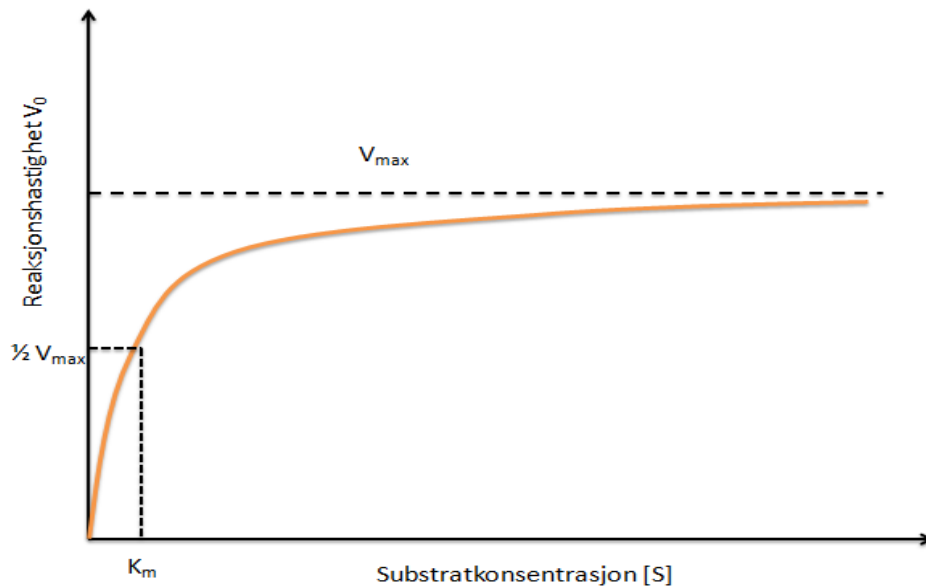
Enzymkinetikk er en kvantitativ beskrivelse av enzymkatalyserte reaksjoner. Det finnes forskjellige enzymkinetiske modeller som benyttes for å estimere kinetiske parametre.

1.3.1 Michaelis-Menten-kinetikk

Enzymkinetikk følger som oftest den klassiske Michaelis-Menten-likningen (likning 2);

$$V = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$$

der variabelen V er reaksjonshastigheten, $[S]$ er substratkonsentrasjonen, V_{\max} er den maksimale reaksjonshastigheten og K_m er Michaelis-Menten-konstanten. K_m tilsvarer substratkonsentrasjonen ved halve V_{\max} [22]. Michaelis-Menten-modellen gir en hyperbol kinetikkprofil (figur 3). Reaksjonshastigheten øker kraftig ved lave konsentrasjoner av substrat og veksten er nesten lineær med substratkonsentrasjonen. Dette varer helt frem til enzymene blir mettet ved høy substratkonsentrasjon og reaksjonshastigheten, V , når maksimal reaksjonshastighet, V_{\max} [23].



Figur 3: Hyperbol kinetikkprofil. V_{\max} er den maksimale reaksjonshastighet, K_m er substratkonsentrasjonen ved halvparten av den maksimale reaksjonshastigheten.

Ved å bruke ikke-lineær regresjon til å beskrive *in vitro*-data med Michaelis-Menten-likningen kan parametrene K_m og V_{\max} estimeres [23]. K_m beskriver substratets affinitet til enzymet, mens V_{\max} er et uttrykk for antall enzymer tilstede og deres katalytiske aktivitet [22]. V_{\max} bestemmes således av k_{cat} og e_0 , der k_{cat} reflekterer den katalytiske konstanten for dannelsen av produkt og e_0 er enzymkonsentrasjon. Det er store variasjoner i V_{\max} (variasjon i e_0) mellom individer, i motsetning regnes K_m -verdien til et substrat å være konstant for et gitt enzym [8]. Disse parametrene kan benyttes som basis for å sammenligne ulike substrater, og for å predikere *in vivo* clearance eller legemiddelinteraksjoner [23]. Michaelis-Menten-kinetikk brukes ofte til å estimere *in vitro* enzymkinetiske parametre som igjen brukes til å beregne clearance intrinsic (CL_{int}) for et legemiddel. CL_{int} er et rent mål på enzymaktiviteten for et legemiddel og vil ikke påvirkes av fysiske forhold som proteinbinding eller blodtilførsel. Den estimerte CL_{int} -verdien brukes videre for å ekstrapolere til *in vivo* situasjon [24]. Når substratkonsentrasjonen er 10 % eller lavere, enn K_m -verdien til substratet, og ved 1.ordens kinetikk kan likning 2 forenkles til likning 3 [24]:

$$V = \frac{V_{\max}}{K_m}$$

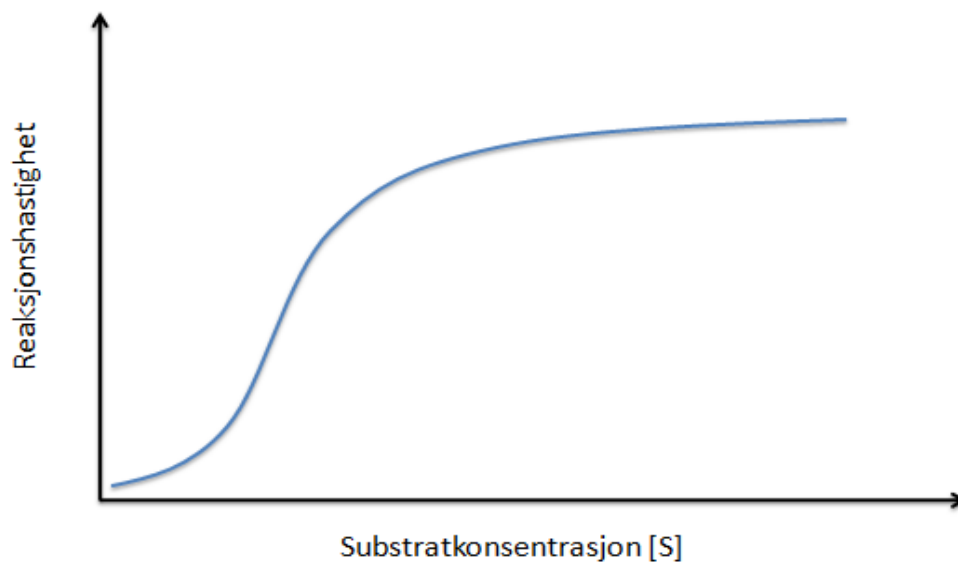
Likning 3 er analog med likning 4 og kan derfor skrives slik [22]:

$$Cl_{int} = \frac{V_{\max}}{K_m}$$

1.3.2 Atypisk kinetikk

En forutsetning for at kinetikk-parametre skal kunne estimeres, ved bruk av Michaelis-Menten-modellen er at det aktive setet i enzymet kun har et bindingssete som kan binde ett substrat av gangen [22, 25]. Flere enzymer, spesielt CYP3A4 har vist at dette ikke alltid er tilfelle. CYP3A4 har et stort aktivt sete som kan tillate flere substratmolekyler å binde seg [26]. Det var lenge antatt at all legemiddelmetabolisme katalysert av enzymer fulgte Michaelis-Menten-kinetikk, men de siste årene har flere legemidler vist en kinetikkprofil som avviker fra den standard hyperbole kurven og isteden følger en såkalt atypisk kinetikk *in vitro* [25]. Atypisk kinetikk inkluderer i dag fem kategorier; aktivering, autoaktivering, bifasisk kinetikk, partiell hemming og substrathemming [27, 28].

Ut i fra disse kategoriene har det blitt rapportert to typer kurvetilpasninger som viser atypisk kinetikk; sigmoidal kurve (figur 4), som mest sannsynlig er et resultat av autoaktivering, og konveks/krummet kurve (ikke vist i oppgaven), som er resultat av substrathemming [25]. Ved autoaktivering vil substratet være en aktivator, to eller flere av samme substrat bindes til det aktive setet i enzymet og aktiverer metabolismen av seg selv [27, 28]. Substrathemming oppstår når økning av substratkonsentrasjon fører til redusert grad av metabolisme, trolig ved at samme substrat bindes til ulike seter på enzymet og påvirker dannelsen av produkt [23, 27, 28]. Begge kinetikkprofilene involverer derfor binding av mer enn et substratmolekyl til enzymet.



Figur 4: Sigmoidal (autoaktivering) kinetikkprofil.

Hill-likningen (likning 5) er den vanligste kinetikkmodellen som beskriver en sigmoidal kinetikkprofil;

$$V = \frac{V_m * [S]^n}{S_{50} + [S]^n}$$

der S_{50} er substratkonsentrasjonen ved halvparten (50 %) av V_{\max} og tilsvarer K_m i likning 2. Hill-koeffesienten (n) gjenspeiler graden av sigmoiditet, der stor n tilsvarer høy grad av sigmoiditet og sterk interaksjon til bindingssetet [25].

1.3.3 Beregning av CL_{int} *in vitro*

Det er i utgangspunktet to konsepter (metoder) som generelt anvendes for å beregne CL_{int} :

1. Metabolittdannelsesmetoden er en av de mest anvendte metodene for å estimere *in vitro* CL_{int} . Produksjonen av metabolitter blir målt som funksjon av substratkonsentrasjon etter inkubasjon med mikrosompreparater, som blant annet humane levermikrosomer (HLM), hepatocytter eller rekombinante systemer. I slike studier benyttes det relativt kort inkubasjonstid og lav enzymkonsentrasjon, dette for å sikre et substrattap lavere enn 10 %, som anses som en forutsetning for bruk av Michaelis-Menten-likningen [29]. Uspesifikk

binding og stabilitetsproblemer i enzympreparatet på grunn av lang inkubasjonstid og høy enzymkonsentrasjon vil da være mindre sannsynlig ved bruk av denne metoden [29]. Ut i fra Michaelis-Menten-modellen bestemmes K_m og V_{max} og likning 3 benyttes for å beregne CL_{int} .

2. En alternativ metode for å estimere CL_{int} er substrattapsmetoden, der forbruket av substrat blir målt som funksjon av tid. Siden substrattapsmetoden ikke krever kvantifisering av metabolitter er denne metoden populær i tidlig fase i utviklingen av nye legemidler [30]. I motsetning til metabolittdannelsesmetoden bør minst 20 % av substratet forbrukes/tapes i løpet av inkubasjonstiden [29]. Dette krever som oftest bruk av høyere enzymkonsentrasjoner og lenger inkubasjonstid sammenlignet med den tradisjonelle metabolittdannelsesmetoden. Til tross for dette anbefales det å bruke lavest mulig inkubasjonstid og enzymkonsentrasjon på grunn av økt risiko for uspesifikk binding og redusert stabilitet i enzympreparatet. En forutsetning for å benytte denne metoden er bruk av lave substratkonsentrasjoner. Den generelle regelen er at substratkonsentrasjonen skal være 1/10 av den laveste K_m -verdien for metabolitt. Dette for å sikre en lineær metabolittdannelse. Når K_m -verdier ikke er kjent for metabolittene anbefales det å bruke en substratkonsentrasjon i størrelsesorden 1 μM eller lavere [31]. Ved beregning av CL_{int} etter bruk av substrattapsmetoden benyttes likning 6;

$$CL_{int} = k * V$$

der V er distribusjonsvolumet og tilsvarende *in vitro* inkubasjonsvolumet som er benyttet. Verdien k (min^{-1}) er hastighetskonstanten for substrattapet og estimeres fra den monofasiske nedbrytningsmodellen som er tilpasset substrattapet (likning 7);

$$C_t = C_0 * e^{-kt}$$

hvor C_0 er substratkonsentrasjonen ved tid lik null minutter ($t=0$).

1.4 *In vitro*-modeller for metabolismestudier

In vitro-studier av legemiddelmetabolisme brukes blant annet for å kunne forutsi mulig metabolisme, hepatisk clearance og interaksjoner med enzymhemmere og/eller enzymindusere for et legemiddel *in vivo*. Studiene utføres ofte tidlig i utviklingen av et nytt legemiddel for å avklare eventuelle farmakokinetiske problemer som kan hindre legemiddelet å få markedsføringstillatelse [22, 32]. Selv om slike studier er mye brukt og metodene veletablerte er det fortsatt utfordringer knyttet til *in vitro-in vivo* ekstrapolering. Faktorer som kan bidra til urimelige *in vivo*-verdier er blant annet eksperimentelle betingelser, interindividuelle variasjoner, metabolisme utenfor lever og aktiv transport i lever [5].

Det finnes ulike metoder for å studere metabolismen av et legemiddel *in vitro*, tre av disse metodene er beskrevet i flere studier [5, 33].

- Humane lever mikrosomer (HLM)
- Hepatocytter
- Rekombinante systemer

HLM er den mest anvendte *in vitro*-metoden for å studere cytokrom P450-kinetikk involvert i legemiddelmetabolisme [22, 32, 33]. Dette har sammenheng med at HLM er lett tilgjengelig, har et lavt kostnadsnivå, enkel i bruk, samt at det er en av de best karakteriserte *in vitro*-modellene. Mikrosomene består av flere enzymer involvert i både fase I- og II-metabolisme av legemidler, deriblant CYP-enzymmer og UDP-glukoronyltransferase (UGT). CYP-aktiviteten i HLM kan variere betydelig som følge av naturlig variasjon fra individ til individ, og det benyttes derfor en blanding av vevsprøver fra ulike individer for å oppnå et mer representativt utvalg av populasjonen [22, 34]. HLM fremstilles ved at leverceller sentrifugeres i 60-120 minutter [7], eller homogeniseres slik at endoplasmatiske retikulum separeres fra levercellen [5]. Fremstillingsprosedyren er enkel, og mikrosomene kan oppbevares ved -80°C i flere år uten at enzymaktiviteten reduseres eller forsvinner. Identifikasjon av metabolitter og enzymer, som er involvert i nedbrytningen av legemidler er derfor blitt raskere og enklere, og det er en årsak til at metoden er mye brukt. I tillegg kan isoenzymenes bidrag i metabolismen av et legemiddel studeres ved tilstedeværelse av

selektive CYP-hemmere [34]. Mikrosomene har derimot lav fase II-aktivitet og inkuberingstiden kan kun foregå i et kort tidsrom (innen 1 time). Legemidler som metaboliseres sakte eller dårlig vil mest sannsynlig ikke metaboliseres i løpet av inkuberingstiden. Ulempene ved bruk av levermikrosomer kan føre til at *in vitro*-resultatene avviker fra det som virkelig skjer *in vivo* [5].

Hepatocytter er intakte leverceller, der plasmamembraner, genekspresjon, ko-enzym, transportproteiner og metabolske veier er vel bevart i flere dager i kultur, samt at de inneholder både fase I- og II-enzymene [5, 33, 35]. Sammenlignet med mikrosomer reflekterer derfor hepatocytterne *in vivo*-situasjonen bedre, og det gjør humane hepatocytter til den beste modellen for å forutsi legemiddelmetabolisme *in vivo* [5]. Inkuberingstiden kan også være lenger ved bruk av hepatocytter. Enzymaktiviteten holder seg stabil i 1-2 timer ved hepatocytter, mens enzymaktiviteten reduseres allerede i løpet av den første timen ved mikrosomer [29]. Muligheten for hepatocytterne til å vokse effektivt *in vitro* er derimot dårlig og tap av differensierte funksjoner, som CYP-aktivitet, kan ses kort tid etter kultivering [36]. Det må derfor fremstilles cellekulturer ofte. Det er i tillegg vanskelig å få tak i leverdonorer og dette har derfor hindret utstrakt bruk av hepatocytter som *in vitro*-modell, til tross for god *in vitro-in vivo* ekstrapolering [5, 37]. Kryopreserverte hepatocytter kan derimot benyttes alternativt for ferske isolerte hepatocytter, da enzymaktiviteten for både fase I- og II-enzym blir bevart lenger [34, 36]. Dette gjøres ved at de isolerte hepatocytterne fryses, slik at den biologiske aktiviteten stanses. Cellene kan deretter lagres inntil anvendelse igjen, uten at metabolismeaktiviteten tapes [37].

Rekombinante systemer er basert på genetisk manipulerede celler som spesifikt uttrykker et CYP-gen. En slik modell vil kunne fortelle om et legemiddel er substrat for det spesifikke CYP-enzymet og hvilke metabolitter som følge av enzymet dannes [5, 22, 34]. Siden det bare er et CYP-enzym som er representert i preparatet vil en slik metode gi et ufullstendig bilde av metabolismen til et gitt legemiddel og modellen brukes derfor som oftest i tillegg til andre modeller, for å bekrefte eller avkrefte hvilke CYP-enzym som er involvert [22]. I tillegg vil en kvantitativ estimering av *in vivo*-situasjonen ikke utføres med en slik modell da det spesifikke CYP-enzymet er overuttrykt og reflekterer ikke *in vivo*-situasjonen [34]. Modellen brukes ofte til å studere substrater som metaboliseres sakte da inkuberingstiden kan foregå i

flere timer [5]. Konsentrasjonen av proteiner (NADPH, cytokrom b5 og lipider i cellemembranen) kan variere i de ulike rekombinante cellene og dermed påvirke resultatet om hvordan CYP- enzymet er involvert i metabolismen av legemiddelet [5].

1.5 Identifikasjon og strukturbestemmelse av ukjente forbindelser

Identifikasjon og strukturbestemmelse av metabolitter er en viktig prosess som utføres tidlig i utviklingen av et nytt legemiddel, blant annet for å kunne evaluere sikkerheten ved bruk av legemiddel *in vivo*. I de siste årene har det blitt utviklet en standardisert prosedyre som ofte blir fulgt ved en slik prosess [38]. Det første trinnet i prosedyren involverer syntese av metabolittene i biologiske systemer. Deretter identifiseres metabolittene ved hjelp av LC/MS eller LC/UV ut i fra kunnskap om nedbrytning av legemiddelet. Kjemikere pleier som oftest å forutsi mulig metabolisme av legemiddelet og dannelse av dets metabolitter i forkant. Strukturbestemmelsen blir utført ved å bruke avanserte MS-metoder etterfulgt av kjemisk syntese eller kjernemagnetisk resonans (NMR) for bekreftelse av strukturene [38]. I de siste årene har kun bruk av tandem-MS (LC-MS/MS) for å strukturbestemme ukjente metabolitter blitt mer vanlig, da det finnes mange ulike MS-teknikker som kan tas i bruk [39]. I tillegg krever ikke en slik metode like mye prøvemateriale og det er en enklere, billigere og raskere metode sammenlignet med kjemisk syntese eller NMR [38].

Trippel-kvadropol er en av de masseanalytorene som er mest benyttet i slike sammenhenger, på grunn av dets høye sensitivitet og mulighet for å anvende flere ulike MS-metoder [40, 41]. Molekylionene blir separert etter forholdet masse og ladning (m/z). En trippel-kvadropol består av tre kvadropoler koblet sammen i rekke. Den første kvadropolen (MS1) velger ut molekylioner av interesse, deretter kollideres og fragmenteres disse ionene i den andre kvadropolen, etterfulgt av en tredje kvadropol (MS2) som gjør en ny utvelgelse av fragmenter fra ioner som ble selektert i MS1 [42]. Resultatet fra en massespektrometrisk analyse registreres i et massespekter, der intensiteten av ioner plottes mot m/z . Et hvert stoff vil ha et spesifikt massespekter og det kan derfor brukes til å bestemme struktur til et ukjent stoff med relativ høy sikkerhet. En ulempe ved bruk av trippelkvadropol som masseanalyzer

er at sensitiviteten for deteksjon reduseres når det utføres fullscan der et stort masseområde skal analyseres [42].

Ved å variere m/z -innstillingene av MS1 og MS2 kan man oppnå en rekke ulike tandem-MS metoder for å detektere stoffer. Flere av disse metodene er vanlig å benytte når ukjente stoffer skal identifiseres og strukturbestemmes.

- ”Product ion scan”, også kalt datterscan, utføres ved at det velges ut et bestemt molekylion i MS1 som fragmenteres i den andre kvadropolen, mens MS2 innstilles på fullt scan. Da vil alle fragmentene som molekylionet fragmenterte til vises i massespekteret. Dette er en metode som gir mye informasjon om strukturen til molekylionet som fragmenteres [43].
- ”Precursor ion scan”, også kalt parent-scan, utføres ved at MS1 innstilles på et område fra lav til høy masse, mens MS2 stilles inn på en spesifikk fragmentmasse av interesse. Da vil kun de molekylionene som danner det spesifikke fragmentet MS2 er innstilt på bli detektert [43].
- ”Neutral loss”, også kalt nøytraltap, benyttes for å detektere molekylioner som har mistet/avspaltet et felles nøytralt fragment. MS1 og MS2 innstilles på en bestemt m/z -differanse som tilsvarer det tapte fragmentet [43].

1.6 Quetiapin

Quetiapin (Seroquel ®) er et atypisk antipsykotisk middel som kom på markedet i 1996 [44]. Det er et legemiddel som påvirker flere nevrotransmittorer i hjernen. Det har moderat til høy affinitet på D₂, 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A}, α₁, M₂, M₃, M₄ og histaminergereseptorer. Det har derimot en lavere affinitet på 5-HT_{2C}, α₂- og D₁-reseptorer, noe som kan forklare at legemidlet i liten grad påvirker kroppsvekt, prolaktinkonsentrasjonen og gir mindre ekstrapyrimidale bivirkninger. Quetiapin er derfor et godt tolerert legemiddel, og et av de antipsykotiske legemidlene som blir mest brukt i dag [45-48].

Quetiapin elimineres fra kroppen primært via metabolisme [46], der både fase I- og II-metabolisme er involvert. Det er i all hovedsak CYP3A4 som står for det meste av metabolismen av quetiapin. Dette har blitt vist i både *in vitro*-studier, der humane lever mikrosomer og rekombinante cytokrom P450 isoenzymer er brukt [49], og i *in vivo*-studier, der samtidig inntak med CYP3A4 hemmere/indusere har vist endret clearance [50]. CYP2D6 metaboliserer quetiapin til den aktive metabolitten 7-hydroksyquetiapin (sammen med CYP3A4), men *in vivo*-studier har vist at denne metabolitten bare dannes i små mengder. Betydningen av CYP2D6 og genetisk polymorfisme i enzymet regnes derfor som lite klinisk relevant [49, 51]. I tillegg til CYP3A4 og CYP2D6, har *in vitro*-studier vist at CYP3A5, CYP3A7 og CYP2C19 også er involvert i nedbrytningen av quetiapin, men av total metabolisme *in vivo* anses bidraget fra disse enzymene å være svært begrenset [52, 53]. Det dannes tilnærmet 20 metabolitter av quetiapin, der 11 av metabolittene er blitt identifisert *in vivo* og to av metabolittene er farmakologisk aktive (7-hydroksyquetiapin og *N*-dealkylquetiapin). Fase I-metabolisme av quetiapin involverer blant annet sulfoksidering, *N*- og *O*-dealkylering og hydroksylering av aminoringen i posisjon 7. [44, 46].

Flere studier gjort på quetiapin har vist at legemiddelet i tillegg til den antipsykotiske effekten også har effekt på symptomer ved depresjon [47, 54-56]. I fire ulike randomiserte, dobbelblindede studier har det blitt påvist at symptomene ved depresjon har blitt redusert allerede i løpet av første uken ved behandling med quetiapin hos pasienter med bipolare lidelser [54-57]. I 2006 ble derfor quetiapin godkjent for indikasjonen ”behandling av pasienter med depressive episoder ved bipolare lidelser”, samt at depotformuleringen også

fikk godkjent indikasjonen ”tilleggsbehandling til antidepressiva hos pasienter med alvorlige depressive lidelser”, i USA [58]. Først i 2010 fikk quetiapin godkjent den førstnevnte indikasjonen i Norge [59]. Den antidepressive effekten medieres primært av den aktive metabolitten *N*-dealkylquetiapien [44].

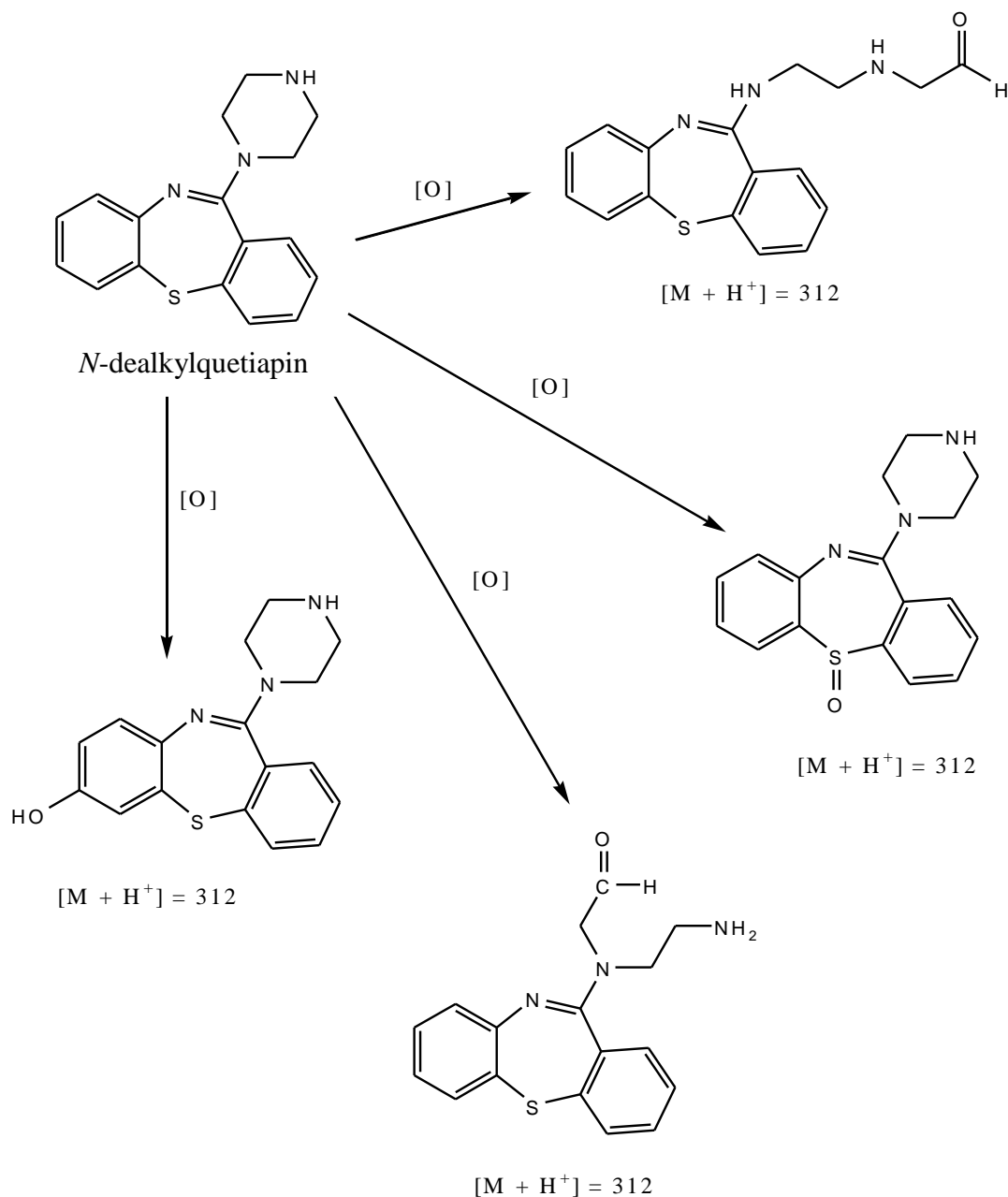
1.7 *N*-dealkylquetiapien

N-dealkylquetiapien, også kalt norquetiapien, er farmakologisk aktiv og en av hovedmetabolittene som dannes fra quetiapien [48]. Det antas at metabolitten er involvert i den kliniske effekten til quetiapien [44].

Studier utført på *N*-dealkylquetiapien har vist at metabolitten har antidepressiv aktivitet og egenskapene til metabolitten regnes som hovedforklaringen bak den antidepressive effekten til quetiapien [44, 60]. Det er blitt utført *in vitro*-studier der metabolitten har blitt testet mot et bredt spekter av reseptorer, ionekanaler og transportører av nevrotransmittorer. Disse studiene har vist at *N*-dealkylquetiapien har lignende virkningsmekanismer som typiske antidepressiva ved at metabolitten er en potent noradrenalin reopptakshemmer, en partiell agonist på 5-HT_{1A}-reseptor og en antagonist på 5-HT_{2A}-reseptor [44, 60]. I de samme studiene ble det vist at quetiapien ikke hadde signifikant effekt via disse mekanismene, noe som tyder på at *N*-dealkylquetiapien står for den antidepressive effekten og ikke quetiapien i seg selv. I tillegg kan den kjemiske strukturen støtte teorien om antidepressiv effekt, da metabolitten har flere struktur-likhetstrekk til typiske trisykliske antidepressiva [44].

Serumkonsentrasjoner av *N*-dealkylquetiapien varierer betydelig mellom individer [61]. Til nå finnes det ingen publiserte studier hvor metabolismen til *N*-dealkylquetiapien beskrives, til tross for at metabolitten er involvert i den kliniske effekten til quetiapien. Strukturlikheter mellom modersubstans og metabolitt fører som oftest til at nedbrytningen av slike stoffer i kroppen følger samme mønster. Siden CYP3A4 og CYP2D6 er involvert i nedbrytningen av quetiapien, kan det være en mulighet for at disse CYP-enzymene også er involvert i metabolismen av *N*-dealkylquetiapien. Som nevnt i punkt 1.6 involverer fase I-metabolisme av

quetiapin blant annet sulfoksidering og hydroksylering av aminoringen i posisjon 7. En eventuell nedbrytning av *N*-dealkylquetiapin i kroppen er ut i fra dette vist i figur 4.



Figur 5: Mulig metabolismevei av *N*-dealkylquetiapin i kroppen

1.8 Hensikt

Det er observert betydelige interindividuelle variasjoner i serumkonsentrasjonen av *N*-dealkylquetiapin etter inntak av samme dose quetiapin. Det vil derfor være viktig å kjenne til metabolismen av *N*-dealkylquetiapin, spesielt med tanke på at den aktive metabolitten trolig er involvert i den antidepressive effekten av quetiapin. Quetiapin metaboliseres hovedsakelig av CYP3A4 og i noe grad av CYP2D6. I dag er det så vidt kjent ingen publiserte studier som har undersøkt videre metabolisme av *N*-dealkylquetiapin, men det er stor sannsynlighet for at metabolitten følger samme mønster som modersubstansen og at derfor CYP3A4 og/eller CYP2D6 også er involvert i nedbrytningen av *N*-dealkylquetiapin.

Hensikten med denne *in vitro*-studien var derfor å kartlegge metabolismen av *N*-dealkylquetiapin og å bestemme om, og eventuelt i hvilken grad CYP3A4 og/eller CYP2D6 er involvert i omsetningen av denne metabolitten.

2 MATERIALER OG METODER

2.1 Utstyr

Tabell 2-1 viser utstyr som er benyttet i oppgaven

Tabell 2-1. *Oversikt over laboratorieutstyr brukt i in vitro-forsøkene*

Utstyr	Produsent
Automatpipetter: Eppendorf research Finnpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland Termo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Ma, USA
Detektor, Micromass Quattro Micro Tandem massespektrometer	Waters Corporation, Milford, MA, USA
Kolonne, C18, 1,0 × 100 mm, 1,7 µm	Waters Corporation, Milford, MA, USA
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
pH-meter, becmann 50 pH meter	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA
Sentrifuge universal 32 R	Hettlich zentrifugen, Tuttlingen, Tyskland
Vannbad	Gallenkamp, England
Vannrensesystem, Milli-Q Synthesis A 10	Millipore, St. Quentin en Yvelines, Frankrike
Vekt, AB54 AB104	Mettler-Toledo Inc., Columbus, OH, USA Mettler-Toledo Inc., Columbus, OH, USA
Vialer	Waters Corporation, Milford, MA, USA
Væskeskromatograf	Waters Corporation, Milford, MA, USA
Wirlmikser, MS 3 basic	IKA Work Inc., La Joll, CA, USA

2.2 Analytter, mikrosomer og kjemikalier

Tabellene nedenfor (tabell 2-2, 2-3 og 2-4) viser analytter, mikrosomer og kjemikalier benyttet i oppgaven.

Tabell 2-2. *Oversikt over analytter*

Analytt	Leverandør
<i>N</i> -dealkylquetiapin	Toronto Research Chemicals Inc., North York, Canada
Promazin	Sigma-Aldrich, St.louis, Missouri, USA
Ketokonazol	Sigma-Aldrich, St.louis, Missouri, USA
Kinidin	Sigma-Aldrich, St.louis, Missouri, USA

Tabell 2-3. *Oversikt over mikrosomer*

Mikrosompreparat	Leverandør
Humane levermikrosomer	BD Gentest, Woburn, MA, USA
Insektmikrosom med CYP3A4 + P450 reduktase	Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Sverige
Insektmikrosom med CYP2D6 + P450 reduktase	BD Gentest, Woburn, MA, USA

Tabell 2-4. *Oversikt over kjemikalier*

Kjemikalier	Leverandør
Acetonitril	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, St.louis, Missouri, USA
EDTA	Ferak, Berlin, Tyskland
Hepes	Sigma-Aldrich, St.louis, Missouri, USA
Maursyre	Sigma-Aldrich, St.louis, Missouri, USA
Metanol	Merck, Darmstadt, Tyskland
MgSO ₄	Merck, Darmstadt, Tyskland
NADPH	Sigma-Aldrich, St.louis, Missouri, USA
Nitrogengass	AGA, AS, Oslo, Norge
Sukrose	Merck, Darmstadt, Tyskland
Trisma-base	Sigma-Aldrich, St.louis, Missouri, USA
Natriumhydroksid	Merck, Darmstadt, Tyskland
H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, Tyskland

2.3 Løsninger

Stockløsninger av *N*-dealkylquetiapin, ketokonazol og kinidin ble laget ved oppløsning av tørrstoff i metanol (MeOH), de to sistnevnte i henholdsvis 1 μM og 4 μM . Det ble laget standardløsninger av *N*-dealkylquetiapin der stockløsningen ble fortynnet i MeOH til ønskede konsentrasjoner. Både stockløsningene og standardløsningene ble oppbevart i fryser ved -20°C . Internstandardløsningen ble laget ved at 250 μl av stockløsningen (promazin 1 mM i MeOH) ble fortynnet med acetonitril til et totalvolum på 25 ml. Løsningen ble oppbevart i kjøleskap. Bufferløsningen som ble brukt som inkubasjonsmiddel og for å reløse analytten ble laget ved at alle tørrstoffene (tabell 2-5) ble løst i ionebyttet vann. NADPH ble laget ny til hvert forsøk og beskyttet mot lys med aluminiumsfolie. MgSO_4 og $\text{Tris-H}_2\text{SO}_4$ ble oppbevart i kjøleskap og byttet ut omtrent etter fire uker.” Lise Madsen”-buffer ble brukt til å fortynne mikrosomene (tabell 2-6). Alle tørrstoffene til bufferen ble løst i ionebyttet vann, og løsningen titrert til pH 7,4 ved bruk av NaOH. Bufferløsningen ble oppbevart i kjøleskap, og det ble laget ny løsning omtrent annen hver uke. Bufferløsningen som ble brukt i standardløsningene ble laget på samme måte som bufferløsningen til å reløse analytt, bortsett fra at NADPH ble erstattet med ionebyttet vann.

Tabell 2-5: Bufferløsning til reløsing av analytt og inkubering av mikrosomer

Bufferløsning	
Tris- H_2SO_4 (200 mM), pH 7,4	130 μl /rør
MgSO_4 (20 mM)	5,5 μl /rør
NADPH (10 mM)	35 μl /rør

Tabell 2-6: Bufferløsning til fortynning av mikrosomer (”Lise Madsen”- buffer)

”Lise Madsen”- buffer	
Sukrose	0,25 M
Hepes	10 mM
EDTA	2 mM

2.4 Generell inkubasjonsprosedyre

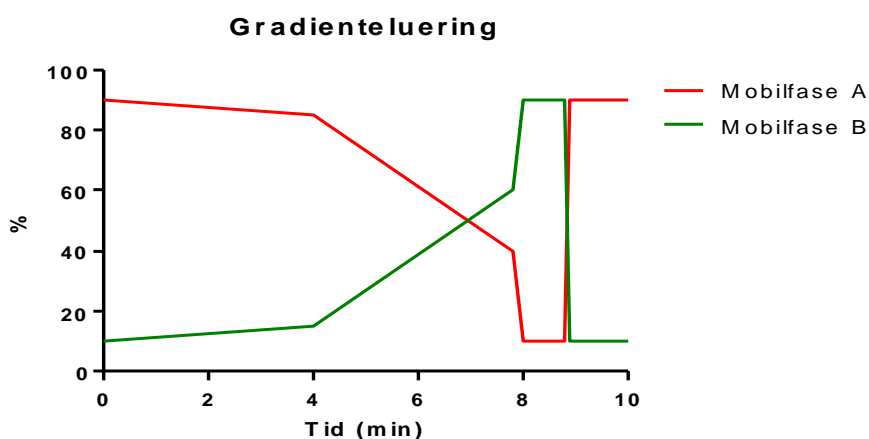
Riktig mengde stockløsning av *N*-dealkylquetiapin i MeOH ble tilsatt et reagensglass og dampet av under nitrogengass. Det ble tilsatt bufferløsning for å reløse inndampet substrat, og substrat/bufferløsning hadde da et totalvolum på 170,5 µl/rør. Konsentrasjonen av de ulike komponentene i bufferløsningen ved inkubasjon var 118 mM (Tris-H₂SO₄), 0,5 mM (MgSO₄) og 1,6 mM (NADPH). Hvert rør ble mikset og preinkubert i 5 minutter på vannbad ved 37 °C. Mikrosomløsninger ble fortynnet i "Lise Madsen"-buffer til ønskelige konsentrasjoner og preinkubert i et par minutter på vannbad ved 37 °C.

Etter preinkubasjon startet forsøket ved at 50 µl mikrosomløsning ble tilsatt til 170,5 µl substrat/bufferløsning. Løsningene ble mikset forsiktig på wirlmikseren før de ble inkubert på vannbad ved 37 °C. Reagensglassene ble tatt ut av vannbadet ved angitte tider og tilsatt acetonitril med internstandard, dette for utfelling av proteiner. Løsningene ble mikset i noen minutter før de ble avkjølt på is i minst 30 minutter. Prøvene ble sentrifugert først i 10 minutter ved 1600 g med stor rotor og deretter i 10 minutter ved 20 000 g med liten rotor (4 °C). Etter sentrifugeringen ble 150-200 µl av supernatanten overført til prøveglass før analyse ved LC/MS-MS. Til et hvert forsøk ble det laget negativkontroller. Det ble laget en substratfriløsning, en mikrosomfriløsning og en blankprøve. Disse ble opparbeidet på samme måte som forklart over, bortsett fra at substrat ble erstattet med bufferløsning i substratfriprøve og mikrosom ble erstattet med "Lise Madsen"-buffer i mikrosomfriprøve. Blankprøve var tilsatt 220,5 µl bufferløsning. Inkubasjonsbetingelsene som ble benyttet er de samme som optimalisert for cyklosporin A av Hermann et al [32].

2.5 LC-MS analyse

Prøvene ble analysert og *N*-dealkylquetiapin og dets metabolitter påvist ved hjelp av væskechromatografisk separasjon med massespektrometrisk deteksjon (LC/MS-MS). Det ble tatt utgangspunkt i en validert metode, fra Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet Sykehus, som ble modifisert noe for å bedre separasjonen av metabolittene. Prøvene (5 µl) ble injisert direkte inn i omvendt-fase C-18 kolonnen hvor analyttene ble separert.

Det ble benyttet gradienteluering med mobilfase A (0,10 M ammoniumacetat, pH 4,8) og mobilfase B (acetonitril), for å separere analyttene fra hverandre (figur 6). I løpet av de første 4 minuttene etter injeksjon av prøven var sammensetningen av mobilfasene nokså konstant, bidraget av mobilfase B økte fra 10 % til 15 %. Deretter steg mobilfase B til 60 % frem til 7,8 minutter, for så å øke raskt til 90 %. Utvasking og reekvilibreringen foregikk fra 8 til 10 minutter, og mobilfase B var da tilbake til sin utgangskonsentrasjon på 10 %. Hastigheten på mobilfasen var 0,2 ml/min gjennom hele analyseforløpet. Total analysetid var 10 minutter for hver prøve. Positiv elektrospay ionisering (ESI) ble benyttet som ioniseringsteknikk.



Figur 6: Oversikt over mobilfasegradienten som ble benyttet for kromatografisk separasjon av analyttene i oppgaven.

De kromatografiske toppene som representerte metabolittene av *N*-dealkylquetiapin ble innledningsvis identifisert ved å benytte såkalte "fullscan" singel MS-analyser av prøver inkubert med humane levermikrosomer (HLM). Karakterisering/strukturebestemmelse av metabolittene ble derimot utført ved bruk av tandem MS-scan metoder (se punkt 2.6.1). Utvalgte tandem MS-fragmenter ble deretter brukt for å detektere metabolittene i senere forsøk basert på fragmenteringsmønster til de ulike metabolittene. Prosesseringen av kromatogrammene og spektrene ble utført ved hjelp av Quanlynx programvare versjon 4,1. Ettersom tørrstoff ikke var tilgjengelig for metabolittene av *N*-dealkylquetiapin, ble konsentrasjonene av analyttene uttrykt som topparealforholdet mellom analytt og intern standard. For *N*-dealkylquetiapin ble konsentrasjonen beregnet ut fra standardkurver som ble kjørt ved hvert forsøk.

2.6 Forsøk med HLM

2.6.1 Påvisning, identifikasjon og strukturbestemmelse av metabolitter

Påvisning, identifikasjon og strukturbestemmelse av metabolitter dannet fra *N*-dealkylquetiapin fulgte tre trinn;

1. For å finne metabolitter som var dannet etter inkubasjon med HLM ble det utført singel MS-scan (MS1-fullscan). MS1 ble innledningsvis innstilt på masse/ladningsforhold (m/z) 100-500 for å fange opp potensielle topper fra metabolitter. Deretter ble samme prøver analysert, og MS1 ble innstilt for å detektere metabolitter med m/z i områdene 200-280 og 300-400. Området mellom m/z 280-300 ble ikke inkludert, dette for å utelukke at *N*-dealkylquetiapin ($m/z = 296$) og/eller internstandard ($m/z = 285$) eventuelt skulle skjule mulige metabolitter med lavere signalintensitet enn disse. For å bekrefte at de kromatografiske toppene som ble mistenkt å stamme fra metabolitter faktisk var metabolitter av *N*-dealkylquetiapin, ble intensiteten av toppene undersøkt som funksjon av inkubasjonstid med HLM (se punkt 2.6.2).
2. Det ble brukt tre ulike tandem MS-metoder for å identifisere og strukturbestemme metabolittene og for å utelukke eventuelle forurensninger. Først ble "product ion scan", også kalt datterscan, utført for å se på fragmenteringsmønsteret til metabolittene. De respektive spektrene til metabolittene ble tolket for å bestemme strukturen til metabolittene. "Precursor ion scan" (parent-scan) og "neutral loss" (nøytraltap) ble brukt for å lete etter andre mulige metabolitter enn det som ble gjenfunnet i fullscan. Optimaliserte verdier av kollisjonsenergi og kildepenning ble benyttet, der verdiene lå mellom 20-30 for begge i de ulike metodene. Tabell 2-7 viser innstillinger ved bruk av de ulike MS-metodene.
3. For videre å avkrefte at metabolittfunnene var forurensninger ble det sammenlignet med analyser av negative kontroller. Hvert forsøk hadde en substratfriprøve, en mikrosomfriprøve og en blankprøve.

Tabell 2-7: Innstillinger for ulike tandem MS-scan metoder.

Tandem-metode:	MS1	MS2
	(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)
“Product ion scan” (datterscan)	312	100-350
“Precursor ion scan” (parent-scan)	200-360 200-360 200-360 200-360	210 221 227 269
”Neutral loss” (nøytraltap) Masse tapt: 48 101 43 85	100-360 100-360 100-360 100-360	100-360 100-360 100-360 100-360

2.6.2 Metabolisme av *N*-dealkylquetiapin som funksjon av tid

Etter at metabolittene var kartlagt var det ønskelig å undersøke enzymkinetiske parametre for dannelsen av de ulike metabolittene. For å bestemme optimal inkubasjonstid for disse forsøkene, ble dannelsen av metabolitter i HLM målt som funksjon av tid i området 0-30 minutter. Det ble valgt å bruke *N*-dealkylquetiapin i en konsentrasjon på 5 µM ved uttestingen. Det ble brukt HLM i fortynningen 1:18, som tilsvarer en proteinkonsentrasjon på 0,25 mg/ml ved inkubasjon. Forsøket ble utført som beskrevet under punkt 2.4 og inkubert i henholdsvis 5, 7.5, 10, 20 og 30 minutter. Det ble laget 2 paralleller til hver inkubasjonstid. Inkubasjonstiden som ble brukt i videre forsøk ble bestemt fra det tidsområdet det var en lineær metabolittdannelse.

2.6.3 Metabolisme av *N*-dealkylquetiapin som funksjon av enzymkonsentrasjon

Det var ønskelig å finne en enzymkonsentrasjon som ga lineær metabolittdannelse. Dette ble bestemt ved å måle dannelsen av metabolitter som funksjon av enzymkonsentrasjon i området fra 0,1 mg/ml til 0,5 mg/ml. HLM ble fortynnet til seks ulike konsentrasjoner, henholdsvis 0,1, 0,15, 0,25, 0,35, 0,45, og 0,5 mg/ml. Forsøket ble utført som beskrevet i punkt 2.4. Prøvene ble inkubert i 10 minutter (bestemt i forsøk beskrevet i punkt 2.6.2) og konsentrasjonen av *N*-dealkylquetiapin var 5 μ M i alle prøvene. Det ble utført to paralleller for hver enzymkonsentrasjon.

2.6.4 Metabolisme av *N*-dealkylquetiapin som funksjon av substratkonsentrasjon

Forsøket ble utført for å estimere K_m -verdier for alle metabolittene til *N*-dealkylquetiapin, for å kunne si noe om deres affinitet til enzym. Det ble brukt 16 ulike konsentrasjoner av *N*-dealkylquetiapin i området fra 1-1000 μ M. Mikrosomløsning ble fortynnet i forholdet 1:18 (0,25 mg/ml ved inkubasjon) og forsøket ble inkubert i 10 minutter (bestemt i forsøk beskrevet i punkt 2.6.3 og 2.6.2). Inkubasjonsprosedyren ble utført som i punkt 2.4. Forsøket ble utført to ganger. Analyser av enzymkinetiske data og kurvetilpasning ble utført ved ikke-lineær regresjon ved hjelp av GraphPad Prism programvare versjon 5.03. Den enzymkinetiske modellen (Michaelis-Menten, Hill eller susbrathemming) som best beskrev forsøksdataene på grunnlag av korrelasjonskoeffesienten (R^2 -verdi) ble benyttet.

2.6.5 Metabolittdannelse etter ko-inkubasjon med CYP-hemmere

For å undersøke om CYP2D6 og/eller CYP3A4 er involvert i nedbrytningen av *N*-dealkylquetiapin ble metabolittdannelsen sammenlignet før og etter ko-inkubasjon med henholdsvis CYP3A4-hemmer (ketokonazol) og CYP2D6-hemmer (kinidin). Konsentrasjonen av *N*-dealkylquetiapin var 3 μ M i alle prøvene og mikrosomløsningen som ble benyttet var fortynnet 1:18 (tilsvarer 0,25 mg/ml ved inkubasjon). Konsentrasjonen av ketokonazol og kinidin ved inkubasjon var henholdsvis 1 μ M og 4 μ M, i tråd med lignende

studier med samme hemmere [7, 50]. I prøvene hvor CYP-hemmer ble tilsatt, ble 20 µl/rør av totalt 170,5 µl/rør bufferløsningen erstattet med 20 µl CYP-hemmer. Inkubasjonsprosedyren var ellers lik som beskrevet i punkt 2.4. Prøvene ble inkubert i 5, 30 og 60 minutter. Forsøket ble repetert tre ganger og gjennomsnittlig endring av topparealforholdet metabolitt/internstandard i prøver med tilsatt hemmer ble sammenlignet med prøver uten hemmer.

2.7 Forsøk med rekombinante insektsmikrosomer

For å få ytterligere informasjon om CYP2D6 og/eller CYP3A4 er involvert i metabolismen av *N*-dealkylquetiapin, ble inkubasjonsforsøk med rekombinante insektsmikrosomer (xenosomer), som spesifikt uttrykker de respektive enzymene, gjennomført.

2.7.1 Substrattap

Forsøkene med rekombinante insektsmikrosomer ble gjennomført etter ”substrattapskonseptet”, der tap av substrat måles som funksjon av tid ved inkubering med enzympreparatet. Det ble benyttet samme inkubasjonsbetingelser (buffer, volumsammensetning med videre) som ved HLM-forsøkene beskrevet i punkt 2.4. Enzymkonsentrasjonen i de rekombinante preparatene var 3,9 pmol/ml ved inkubasjon for begge og innholdet av cytokrom P450 var 0,85 pmol for CYP3A4 og 0,86 pmol for CYP2D6 (total proteinmengde ved inkubasjon var henholdsvis 8 og 6,5 µg). Ingen av insektsmikrosomene som ble benyttet var ko-transfektet med cytokrom b₅. Forbruket (”tapet”) av *N*-dealkylquetiapin ble målt som funksjon av tid (0-60 minutter). Prøvene ble inkubert i 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 og 60 minutter. Det ble benyttet en konsentrasjon av *N*-dealkylquetiapin som var lavere enn K_m -verdiene til alle metabolittene basert på informasjon fra forsøk skissert i punkt 2.6.4 (3µM). Det enkelte forsøk ble repetert tre ganger og i hvert forsøk ble det laget to paralleller. Konsentrasjonen av *N*-dealkylquetiapin ble beregnet fra standardkurver i hvert forsøk. CL_{int} for CYP2D6- og CYP3A4-mediert metabolisme av *N*-dealkylquetiapin i insektsmikrosomene ble beregnet ved bruk av likning 6 (punkt 1.3.3), der distribusjonsvolumet tilsvarer inkubasjonsvolumet (220,5 µl) i forsøkene. Tilpasning av

substrattapsdataene til et monoeksponensielt kurveforløp med estimering av eliminasjonskonstanten ble gjort ved bruk av GraphPad Prism programvare versjon 5.03.

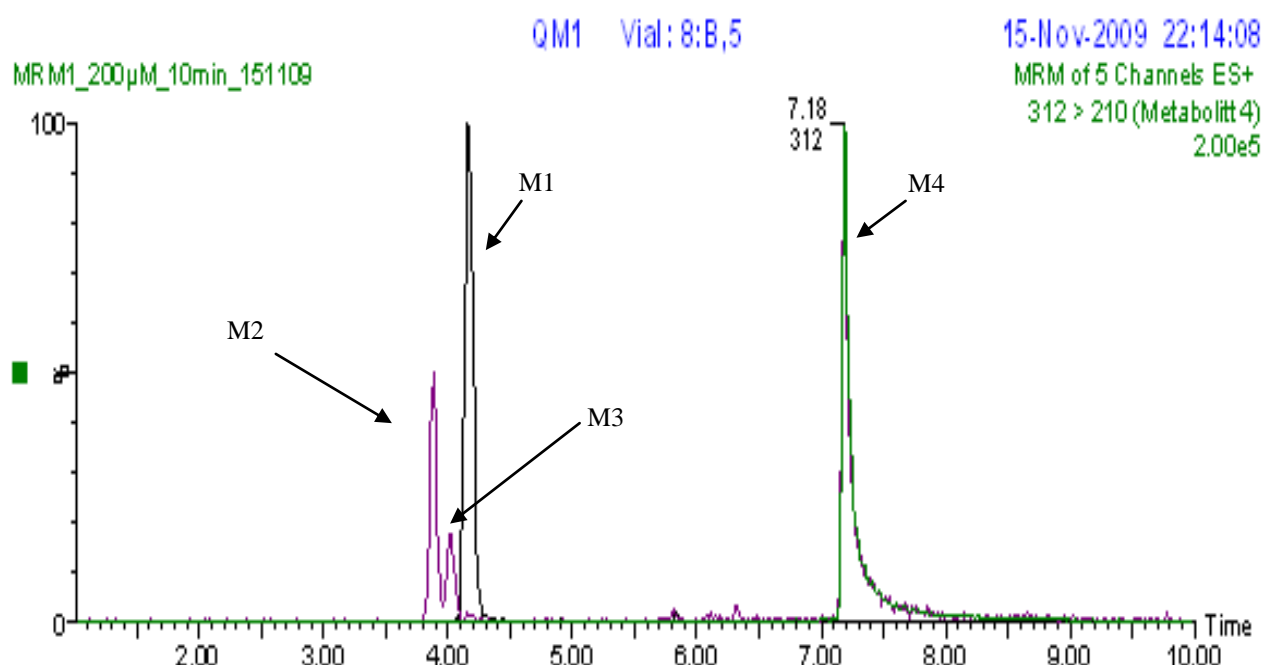
Parallelt med nedgangen i substratkonsentrasjon ble også dannelsen av metabolitter målt. Den relative dannelsen av metabolitter etter inkubasjon med CYP2D6- og CYP3A4-mikrosomer ble sammenlignet med følsomheten overfor henholdsvis kinidin- og ketokonazol ved ko-inkubasjon i HLM-forsøket beskrevet i punkt 2.6.5.

3 RESULTATER

3.1 Forsøk med HLM

3.1.1 Identifikasjon av metabolitter

Det ble identifisert fire kromatografiske "topper" som sannsynligvis representerte metabolitter av *N*-dealkylquetiapin etter inkubasjon i 10 minutter (figur 7). Det var flere holdepunkter for at toppene representerte metabolitter. For det første økte topphøydene med inkubasjonstid og ble redusert ved tilsetning av CYP-hemmere. Både "precursor ion scan" (parent-scan) og "neutral loss" (nøytraltap) ble utført for å eventuelt identifisere andre mulige metabolitter enn de fire som allerede var funnet. Metodene viste ingen nye toppler som kunne identifiseres som metabolitter. Negativkontrollene som var til stede i hvert forsøk bekreftet at metabolittene ikke var forurensninger ved at metabolittoppene som ble vist i kromatogrammene hadde lav intensitet eller ikke var tilstede. På bakgrunn av dette ble fire metabolitter identifisert med høy sikkerhet.



Figur 7: Kromatogram (MRM-scan) med dannede metabolitter av *N*-dealkylquetiapin.

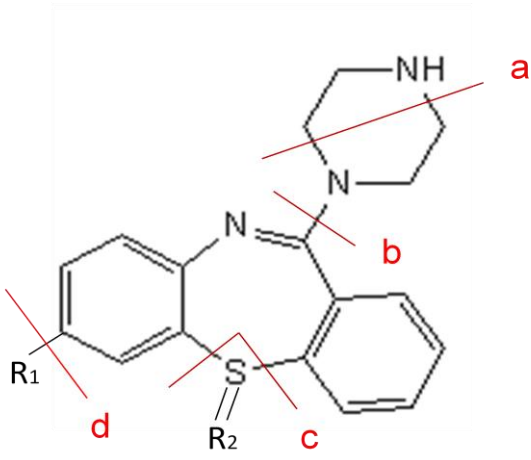
*De fire toppene representerer sannsynligvis fire metabolitter (metabolitt 1-4) av *N*-dealkylquetiapin dannet etter inkubasjon med HLM i 10 min (200 µM substratkonsentrasjon)*

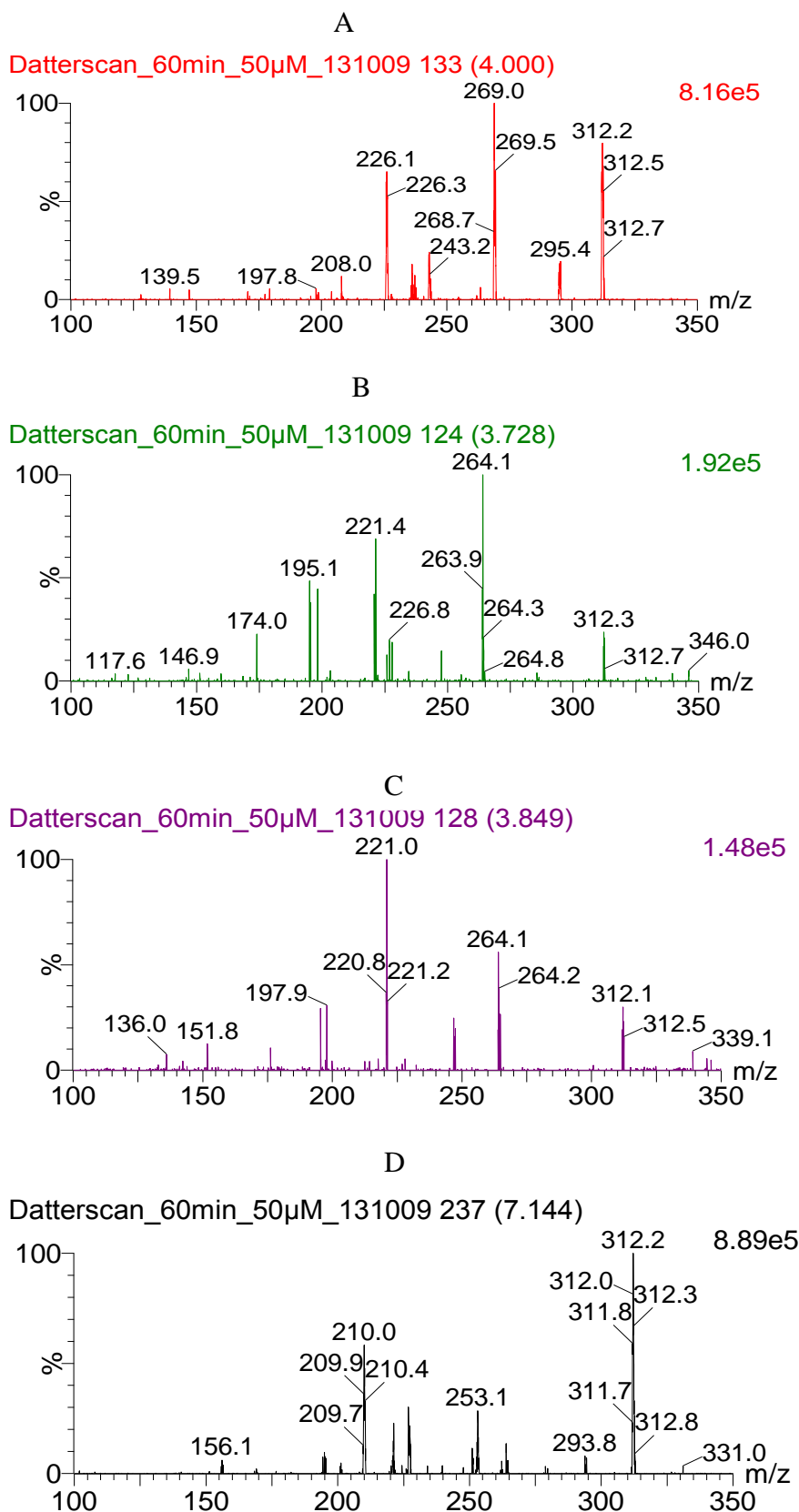
3.1.2 Strukturbestemmelse av metabolitter

Strukturbestemmelsen av de ulike metabolittene ble utført ved bruk av massespektrometri med utgangspunkt i tolkning av product ion scan (datterscan). Alle fragmenter/datterioner til et spesifikt molekyllion vil da vises i MS/MS-spektra. Figur 8 viser MS/MS-spekterene til metabolitt 1-4. Etter tolkning av fragmenteringsmønstrene ble to metabolitter identifisert som henholdsvis 7-hydroksy-metabolitt (7HM) og sulfoksid-metabolitt (SM). De resterende to metabolittene lot seg ikke med sikkerhet identifisere ved vurdering av MS/MS spektra, men flere av datterionene til disse metabolittene er like datterionene til 7HM og SM. Videre i oppgaven vil de to metabolittene som ikke ble identifisert omtales som MX₁ og MX₂.

Mulige datterioner som kan dannes ved fragmentering av 7HM og SM er presentert i tabell 3-1. Disse datterionene kan også gjenfinnes i figur 8. Tabellen viser ikke datterioner som kan dannes ved fragmentering av MX₁ og MX₂ på grunn av strukturen til disse metabolittene ikke er identifisert.

Tabell 3-1: Antatt fragmenteringsmønstre for 7-hydroksy-metabolitt (7HM) og sulfoksid-metabolitt (SM).

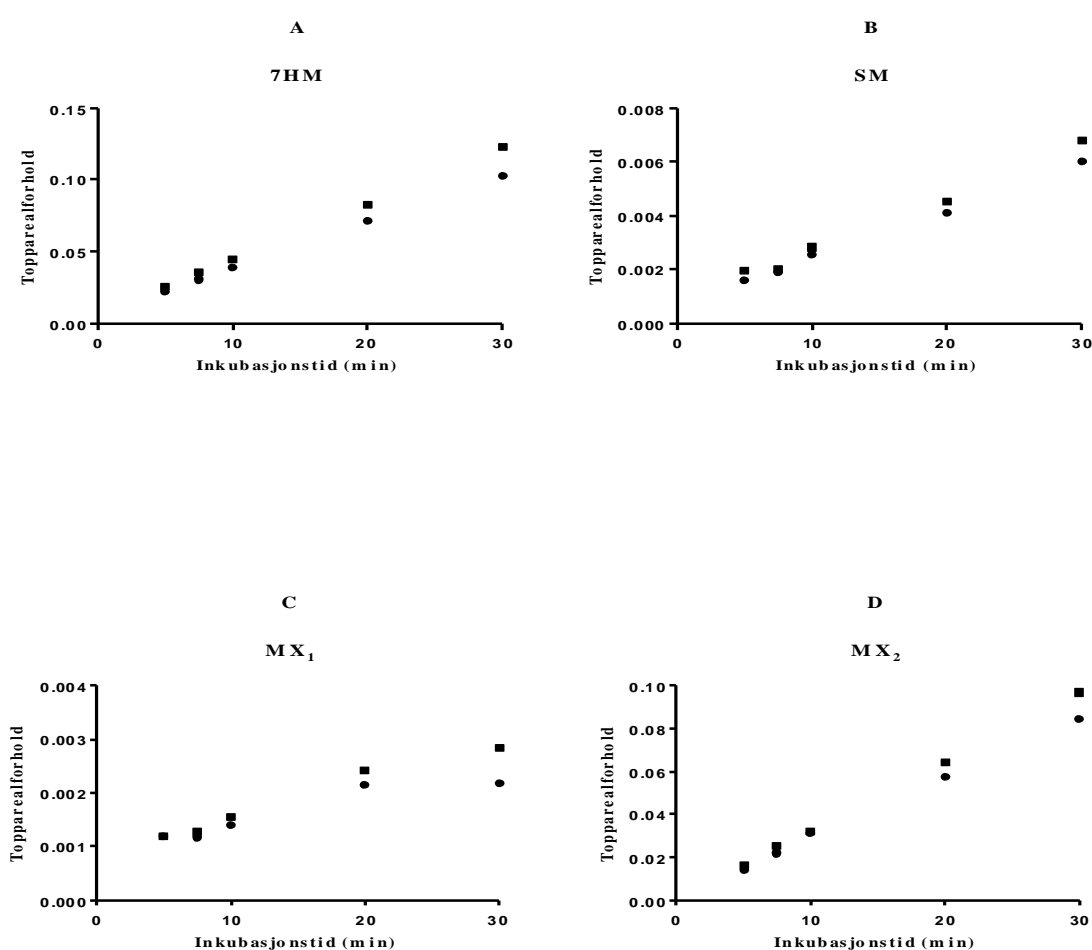
		7-hydroksy-metabolitt R1 = OH R2 = ingen	Sulfoksid-metabolitt R1 = H R2 = O
		(m/z)	(m/z)
	A	269	269
	B	226	226
	C		264
	A C		221
	D	295	



Figur 8. MS/MS fragmenteringsspekter. MS/MS-spekter for 7-hydroksy-metabolitt (7HM, A), sulfoksid-metabolitt (SM, B), uidentifisert metabolitt 1 (MX₁, C) og uidentifisert metabolitt 2 (MX₂, D) etter inkubasjon av 50 µM N-dealkylquetiapin i 60 minutter.

3.1.3 Metabolisme av *N*-dealkylquetiapin som funksjon av tid

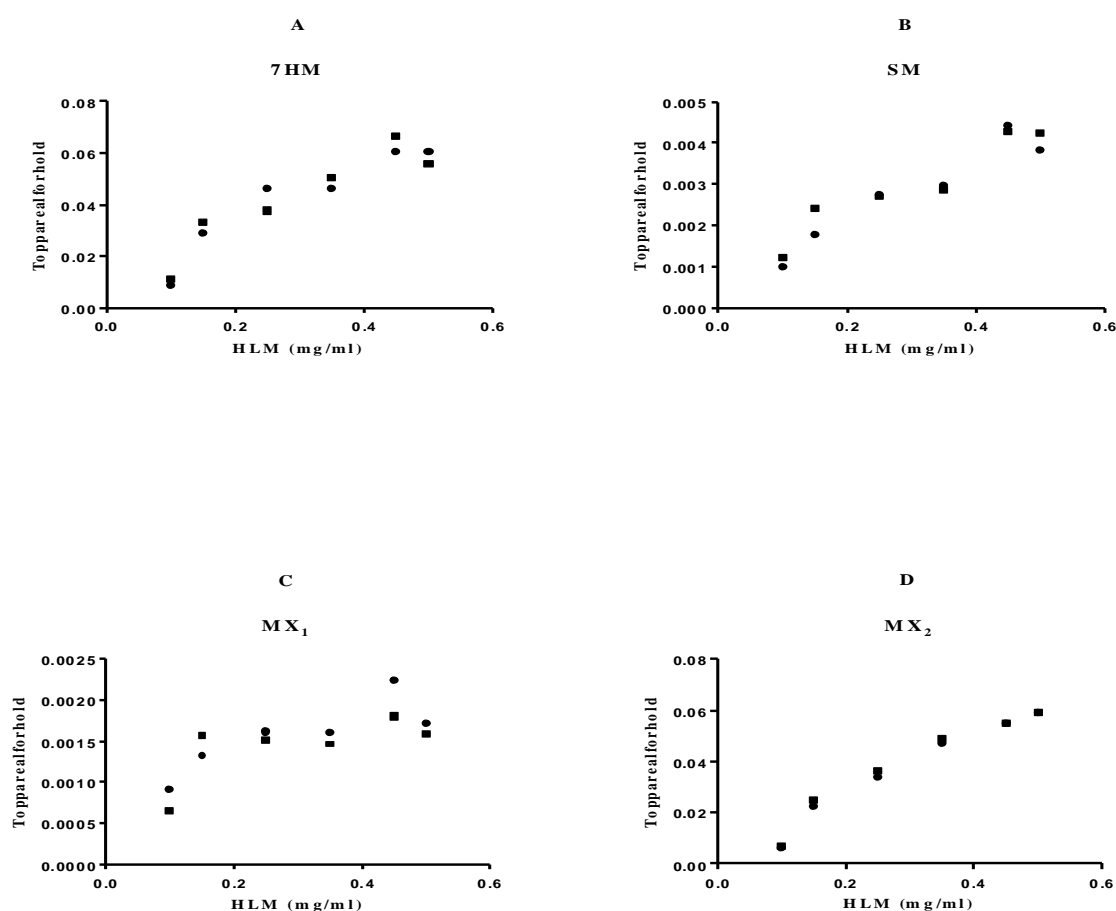
Figur 9 viser dannelsen av metabolitter etter inkubasjon i tidsområdet 0-30 minutter. 7HM, SM og MX₂ viser en lineær metabolittdannelse i hele tidsforløpet, mens MX₁ ser ut til å avvike fra dette etter ca 20 minutter. Avviket fra lineær metabolittdannelse kan skyldes en ikke-lineær respons i MS-detektoren, siden dannelsen av metabolittene angis som topparealforhold på grunn av mangel på tørrstoff. Alle metabolittene viser en lineær dannelse frem til 10 minutters inkubasjon og på bakgrunn av dette ble 10 minutter brukt som inkubasjonstid i senere forsøk.



Figur 9. Metabolisme av *N*-dealkylquetiapin som funksjon av tid. Hastighetskurver for 7-hydroksy-metabolitt (7HM, A), sulfoksid-metabolitt (SM, B), uidentifisert metabolitt 1 (MX₁, C) og uidentifisert metabolitt 2 (MX₂, D) ved inkubasjon av 5 μ M *N*-dealkylquetiapin. Kurvene viser data fra to paralleller. Dannelsen av metabolittene ble beregnet som topparealforhold siden tørrstoff ikke er tilgjengelig.

3.1.4 Metabolisme av *N*-dealkylquetiapien som funksjon av enzymkonsentrasjon

Optimal enzymkonsentrasjon ble også bestemt for videre å sikre en lineær metabolittdannelse i konsentrasjonsforsøkene. 7HM, SM og MX₂ viste også i dette forsøket tilnærmet lineær metabolittdannelse i hele enzymkonsentrasjonsforløpet, mens dannelsen av MX₁ viste avvik fra dette. Til tross for dette ble det valgt å bruke 0,25 mg/ml HLM i senere forsøk, da dette er en HLM-konsentrasjon som er høy nok for å få relativ metabolittdannelse og lavere enn høyeste anbefalte konsentrasjon (0,5 mg/ml) [29].



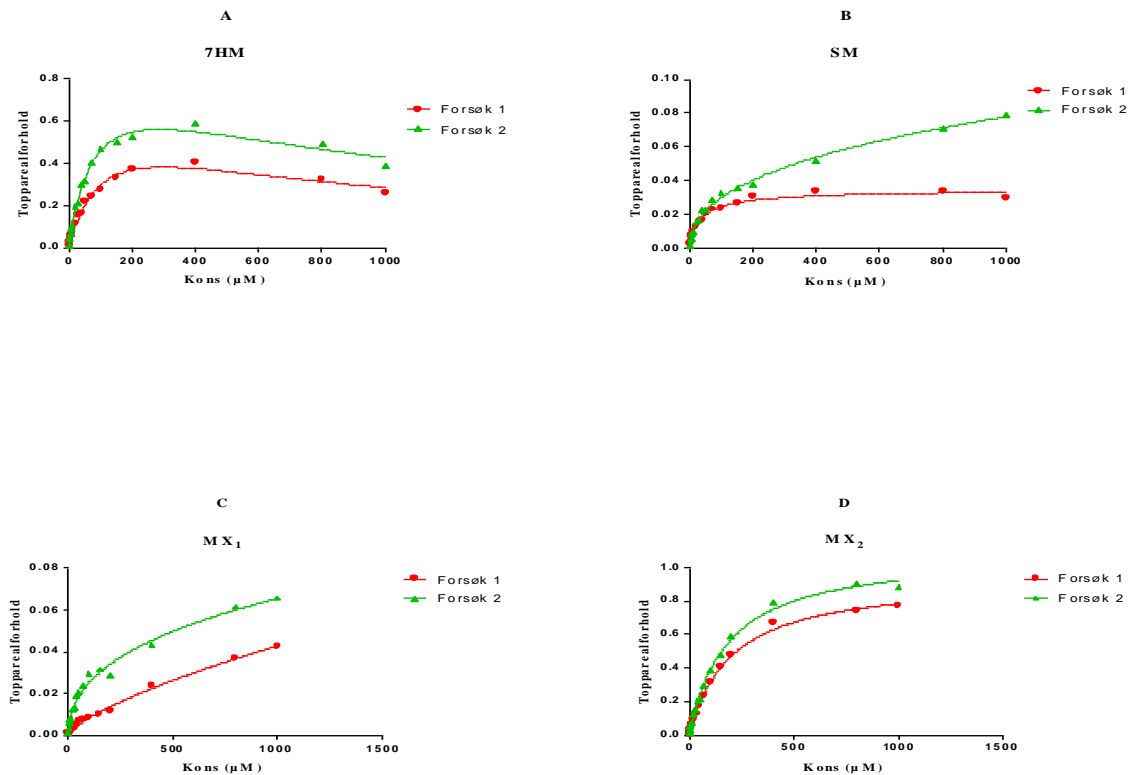
Figur 10. Metabolisme av *N*-dealkylquetiapien som funksjon av enzymkonsentrasjon.

Dannelse av for 7-hydroksy-metabolitt (7HM, A), sulfoksid-metabolitt (SM, B), uidentifisert metabolitt 1 (MX₁, C) og uidentifisert metabolitt 2 (MX₂, D) etter inkubasjon av 5 μ M *N*-dealkylquetiapien i 10 minutter. Kurven viser verdier fra to paralleller. Dannelsen av metabolittene ble beregnet som topparealforhold siden tørrstoff ikke er tilgjengelig.

3.1.5 Metabolisme av *N*-dealkylquetiapin som funksjon av substratkonsentrasjon

Dannelse av metabolittene som funksjon av *N*-dealkylquetiapin konsentrasjon fra to separate forsøk er vist i Figur 11. Mønsteret for dannelsen av metabolitter var likt for 7HM og SM i de to individuelle forsøkene, men mønsteret for MX₁ og MX₂ var noe forskjellig i de to forsøkene. Dose-responskurvene for SM og MX₁ ga best tilpasning med Hill-likningen (likning 5, punkt 1.3.2) mens dannelsen av 7HM og MX₂ ga best tilpasning med henholdsvis substrathemming og Michaelis-Menten-likningen (sistnevnt vist som likning 2 i punkt 1.3.1). De enzymkinetiske modellene angitt for metabolittene ble bestemt på bakgrunn av hvilken modell som best beskrev dataene ut ifra R²-verdien. Alle R²-verdiene var $\geq 0,9$ for metabolittene.

Metabolittdannelsesmetoden er en vanlig metode som benyttes for å estimere enzymkinetiske parametre (K_m/S_{50} -verdi, V_{max} og CL_{int}) for metabolismen av et legemiddel. Tørrstoff var ikke tilgjengelig for metabolittene og på bakgrunn av dette kunne ikke V_{max} og CL_{int} bli estimert. De estimerte K_m/S_{50} -verdiene fra to individuelle forsøk var 109 og 77 μM for 7HM, 19 og 118 μM for SM, >1000 og 120 μM for MX₁ og 197 og 178 μM for MX₂. Alle metabolittene viste konsentrasjonsavhengig dannelse og lavest K_m/S_{50} -verdi ble observert for 7HM og SM. Dette indikerer at disse metabolittene har god affinitet til enzym. Dannelse av MX₁ viste ikke tegn til metning ved den høyeste konsentrasjonen av *N*-dealkylquetiapin i det ene forsøket (1000 μM), og S_{50} ble derfor estimert til $> 1000 \mu M$.



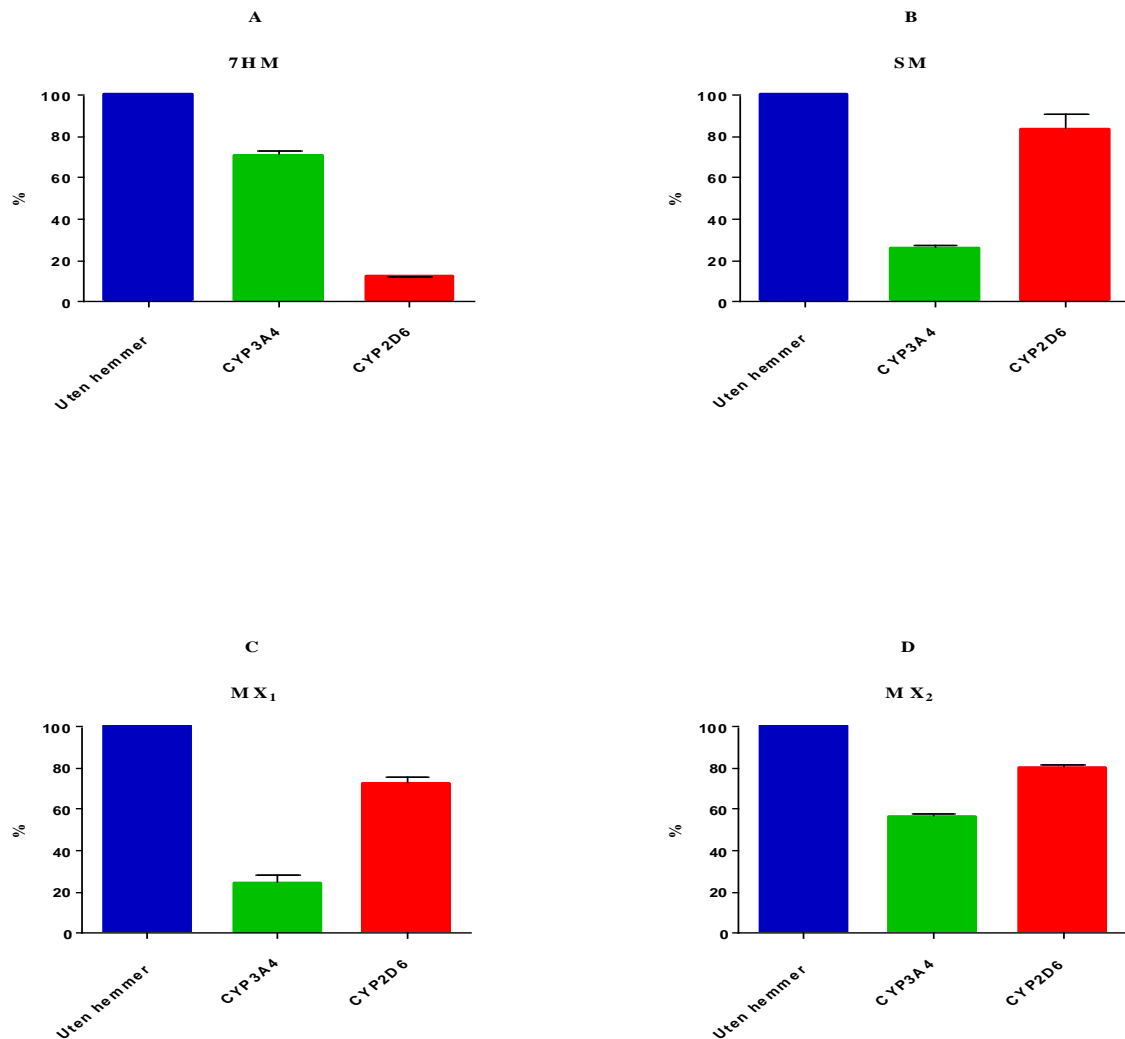
Figur 11. Metabolisme av *N*-dealkylquetiapin som funksjon av substratkonsentrasjon.

Dose-respons kurver for dannelsen av de fire metabolittene, for 7-hydroksey-metabolitt (7HM, A), sulfoksid-metabolitt (SM, B), uidentifisert metabolitt 1 (MX₁, C) og uidentifisert metabolitt 2 (MX₂, D) etter inkubasjon i 10 minutter fra to separate forsøk. Kurvene representerer beste kurvetilpasning med Michaelis-Menten (D), substrathemming (A) eller Hill-likningen (B og C).

3.1.6 Relativ metabolittdannelse etter ko-inkubasjon med CYP-hemmere

For å identifisere et eventuelt bidrag av CYP2D6 og/eller CYP3A4 i metabolismen av *N*-dealkylquetiapin ble det gjort ko-inkubasjonsforsøk med CYP2D6-hemmeren-, kinidin og CYP3A4-hemmeren-, ketokonazol med HLM. Figur 12 illustrerer prosentvis metabolittdannelse med og uten hemmer basert på tre separate forsøk. Dannelsen av 7HM ble redusert med 88 % ved tilsetting av CYP2D6-hemmer, i motsetning til 30 % reduksjon ved tilsetting av CYP3A4-hemmer. CYP3A4 viste seg derimot å være viktig for dannelsen av SM og MX₁, da CYP3A4 hemmeren reduserte dannelsen av metabolittene med ca 74 og 76 % sammenlignet med 25 % og 30 % reduksjon med CYP2D6-hemmeren. Det var ikke så stor forskjell i dannelsen av MX₂ ved tilsetning av hemmerene, dannelsen av metabolitten var noe mindre ved CYP3A4-hemmer tilstede.

Substrattap av *N*-dealkylquetiapin ble også undersøkt med og uten hemmere i forsøk med HLM, men forbruket var lavere enn 15 % etter 60 minutters inkubasjon (figur ikke vist), og dataene var derfor ikke egnet for CL_{int}-estimer av HLM-mediert metabolisme av *N*-dealkylquetiapin.



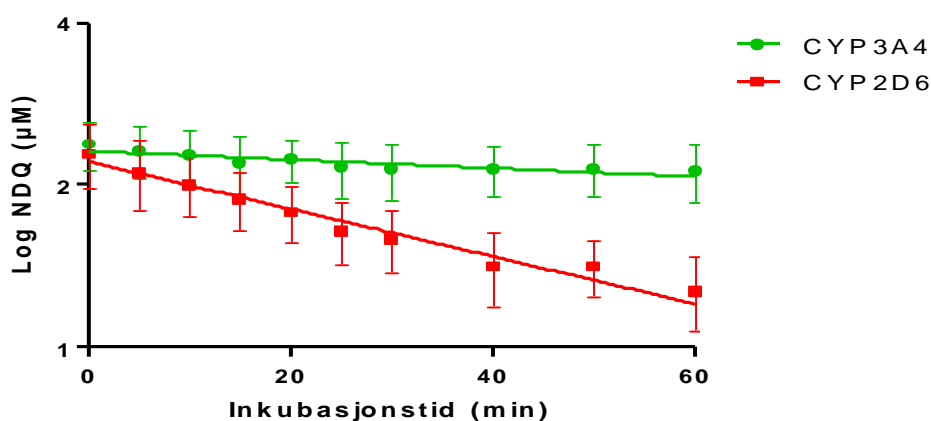
Figur 12. Prosentvis metabolittdannelse etter inkubasjon med og uten hemmere.

Dannelse av de fire metabolittene, 7-hydroksy-metabolitt (7HM, A), sulfoksid-metabolitt (SM, B), uidentifisert metabolitt 1 (MX₁, C) og uidentifisert metabolitt 2 (MX₂, D) etter inkubasjon med 3 μ M av N-dealkylquetiapin. Målingene ble gjort etter 60 minutters inkubasjonstid. CYP3A4-hemmeren ketokonazol og CYP2D6-hemmeren kinidin ble brukt i konsentrasjonen 4 μ M og 1 μ M. Tallene er gjennomsnitt fra tre separate forsøk. "Error bar" er angitt som standardavvik.

3.2 Forsøk med rekombinante insektmikrosomer

3.2.1 Substrattap

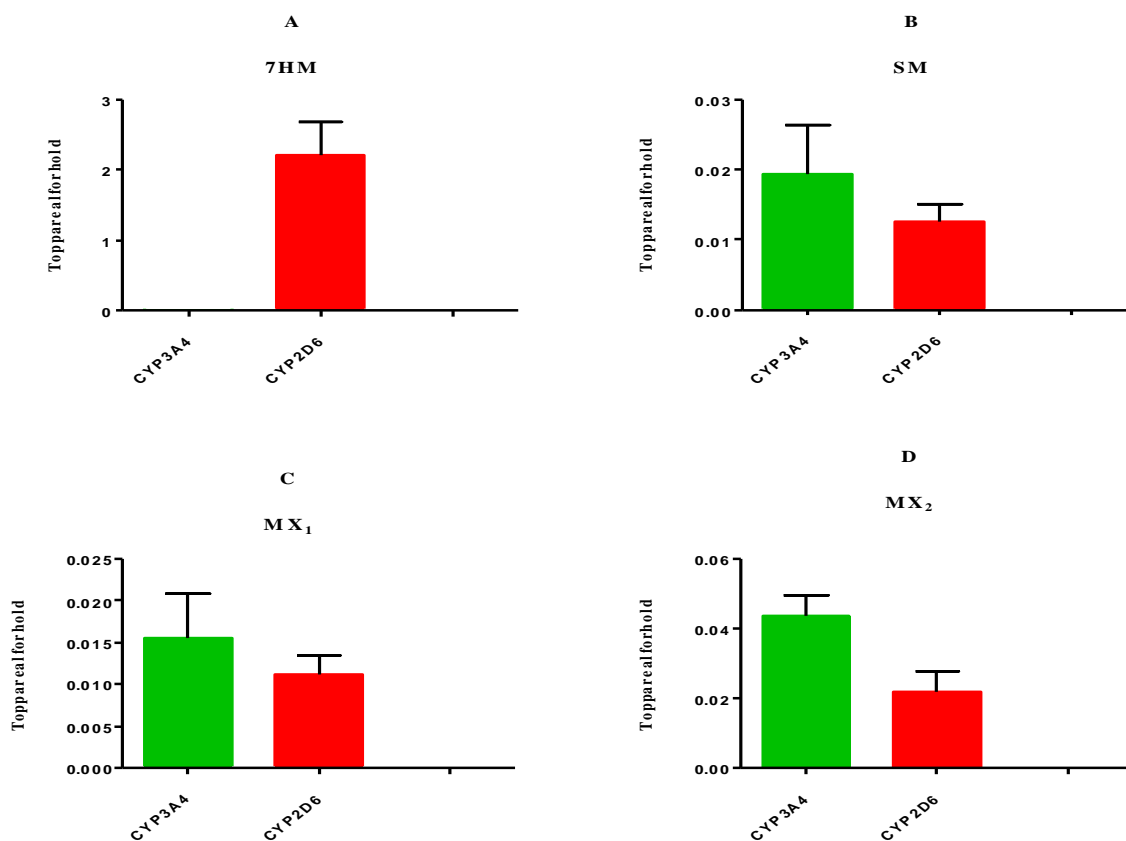
Forbruk av *N*-dealkylquetiapin som funksjon av tid (0-60 minutter) ved inkubasjon med CYP3A4- og/eller CYP2D6-mikrosomer viste en monoeksponensiell nedgang (figur 13). Substrattapet var lineært i hele tidsforløpet for alle forsøkene ($n=3$) ved semilogaritmisk plott. Konsentrasjonen til *N*-dealkylquetiapin ble beregnet fra standardkurver kjørt ved hvert forsøk, mens CL_{int} ble beregnet fra likning 6 (punkt 1.3.3). Den gjennomsnittlige estimerte CL_{int} -verdien fra tre individuelle forsøk for CYP3A4 var $0,5 \pm 0,08$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{pmol}$ CYP (gj.snitt \pm st. avvik), mens for CYP2D6 var den $3 \pm 0,31$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{pmol}$ CYP (gj.snitt \pm st. avvik). Det vil si en 6 ganger større CL_{int} for CYP2D6 sammenlignet med CYP3A4. Dette viser også at i bekreftelsesforsøket er CYP2D6 viktig for metabolismen av *N*-dealkylquetiapin *in vitro*.



Figur 13. Substrattapkurve ved 3 μM *N*-dealkylquetiapin. Forbruk av *N*-dealkylquetiapin etter inkubasjon med rekombinant CYP3A4 og CYP2D6 i tidsområdet 0-60 minutter. Kurvene representerer gjennomsnitt fra tre individuelle forsøk. "Error bar" er angitt som standardavvik.

3.2.2 Relativ metabolittdannelse

Den relative dannelsen av metabolitter ble også undersøkt etter inkubasjon i 60 minutter av 3 μ M *N*-dealkylquetiapin (figur 14). Dette for å kunne sammenligne metabolittdannelsen i HLM med rekombinante mikrosomsystemer. Alle metabolittene som ble dannet etter inkubasjon med HLM ble også dannet i både CYP3A4 og CYP2D6 mikrosomer. Mengde av metabolittene som ble dannet varierte i de ulike rekombinante systemene. 7HM ble tilnærmet kun dannet via CYP2D6 sammenlignet med CYP3A4, 99,8 % mot 0,2 %. Det motsatte ble vist for SM, MX₁ og MX₂, der dannelsen var lavere via CYP2D6. Det ble dannet 32 %, 24 % og 50 % mer av henholdsvis SM, MX₁ og MX₂ via CYP3A4. Det samme metabolittdannelsesmønsteret ble sett i figur 12 hvor *N*-dealkylquetiapin ble inkubert med HLM med og uten hemmere. CYP2D6-hemmeren reduserte dannelsen av 7HM i størst grad, mens CYP3A4-hemmeren reduserte dannelsen av SM, MX₁ og MX₂ i størst grad. På bakgrunn av dette kan man med stor sikkerhet si at CYP2D6 er viktig for dannelsen av 7HM, mens CYP3A4 er av større betydning for dannelsen av de andre metabolittene.



Figur 14. Relativ metabolittdannelse etter inkubasjon i 60 minutter med rekombinant CYP3A4 og CYP2D6. Dannelse av for 7-hydroksey-metabolitt (7HM, A), sulfoksid-metabolitt (SM, B), uidentifisert metabolitt 1 (MX₁, C) og uidentifisert metabolitt 2 (MX₂, D) etter inkubasjon av 3 μ M N-dealkylquetiapin. Dataene representerer et gjennomsnitt fra tre separate forsøk. "Error bar" er angitt som standardavvik.

4 DISKUSJON

Quetiapin metaboliseres hovedsakelig av CYP3A4 og i noe grad av CYP2D6 [46]. I dag er det så vidt kjent ingen publiserte studier som har undersøkt videre metabolisme av den aktive metabolitten *N*-dealkylquetiapin, til tross for at den trolig er involvert i den antidepressive effekten av quetiapin. Hensikten med denne masteroppgaven var derfor å kartlegge metabolismen av *N*-dealkylquetiapin og å bestemme om, og eventuelt i hvilken grad CYP3A4 og/eller CYP2D6 er involvert i omsetningen av denne metabolitten.

4.1 Metabolittdannelse via CYP2D6 og CYP3A4

I de innledende eksperimentene ble det forsøkt å identifisere og strukturbestemme metabolitter som ble dannet etter inkubasjon av *N*-dealkylquetiapin med HLM. Forsøket viste fire kromatografiske topper som mest sannsynlig representerte metabolitter av *N*-dealkylquetiapin. To av disse toppene/metabolittene lot seg strukturbestemme relativt sikkert ved fortolkning av MS/MS-spektra, det vil si 7-hydroksy-metabolitten (7HM) og sulfoksid-metabolitten (SM). MS/MS-spekterene til disse metabolittene viste relativt spesifikke fragmenter/datterioner, men for 7HM var det derimot vanskelig å fastslå med sikkerhet i hvilken posisjon hydroksylgruppen sitter. Ettersom metabolismestudier med quetiapin har vist hydroksylering i 7-posisjon, ble det imidlertid antatt at hydroksylgruppen også var lokalisert til posisjon 7 for *N*-dealkylquetiapin. I tillegg vil andre posisjoner i molekylet være mindre utsatt for hydroksylering på grunn av sterisk hindring.

To av metabolittene påvist i denne oppgaven lot seg ikke strukturbestemme og refereres som MX₁ og MX₂. MX₁ hadde det samme MS/MS-spekteret som SM, men intensiteten til de ulike fragmentene varierte. Siden et fragmentmønster er spesifikt for det enkelte stoffet, kan dette tyde på at MX₁ og SM har lik kjemisk struktur. En mulighet er at de representerer to ulike steriske former av samme substans, noe som kan forklare at de separeres kromatografisk og har ulik intensitet av MS/MS-fragmenter. Dette er en teori som eventuelt må undersøkes nærmere med andre metoder enn MS/MS-analyse, for eksempel NMR-spektroskopi, dersom identitet til MX₁ skal kunne fastslås med sikkerhet. Den kromatografiske toppen til MX₁ har

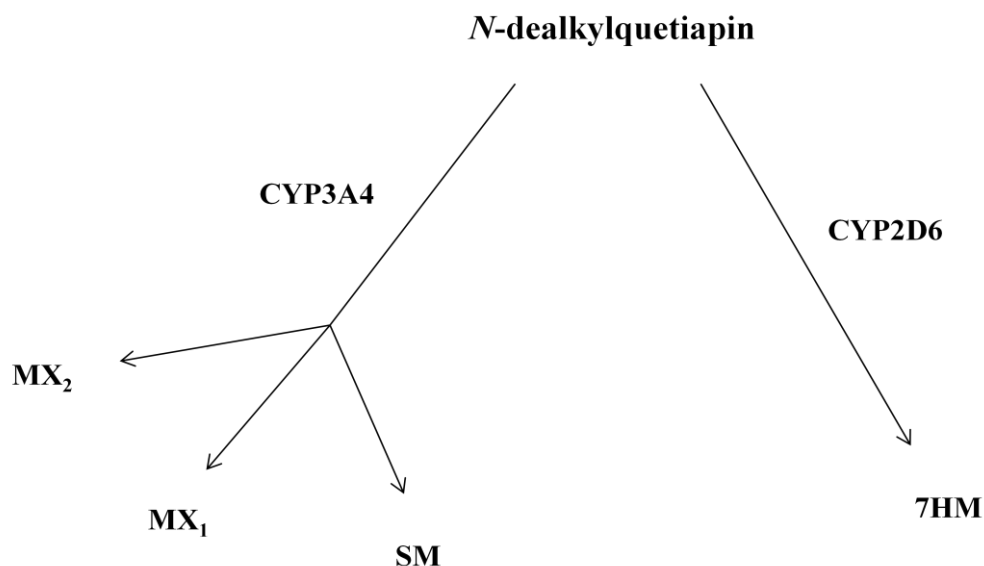
imidlertid så lav intensitet i forhold til topphøyde, at det er liten grunn til å tro at dette er en sentral metabolitt i omsetningen av *N*-dealkylquetiapin.

I MS/MS-spekteret til den siste metabolitten, MX₂, ble det vist to fragmenter/datterioner som kan tyde på struktur A og/eller C vist i figur 5 under punkt 1.7. Det var derimot vanskelig å fastslå den mest sannsynlige strukturen basert på tolkning av MS/MS-spekteret for MX₂ og endelig strukturbestemmelse av metabolitten ble derfor ikke utført i denne oppgaven. I forhold til MX₁ kan det tyde på at MX₂ er av større relevans ut i fra at den kromatografiske toppen har en høyere intensitet i forhold til topphøyde. I videre studier kan det derfor være mer aktuelt å undersøke identiteten til MX₂ nærmere ved bruk av andre metoder enn LC-MS/MS.

Videre ble dannelsen av 7HM, SM, MX₁ og MX₂ studert i HLM-forsøk med og uten ko-inkubasjon med henholdsvis CYP3A4-hemmer (ketokonazol) og CYP2D6-hemmer (kinidin), for å kunne si noe om disse enzymenes effekt på *in vitro*-metabolismen av *N*-dealkylquetiapin. Dannelsen av de fire metabolittene ble redusert ved tilsetning av både CYP2D6-hemmeren, kinidin og CYP3A4-hemmeren, ketokonazol. Resultatene viste at kinidin reduserte dannelsen av 7HM sterkest (ca 90 %), mens ketokonazol reduserte dannelsen av SM og MX₁ mest (ca 75 %). Dannelsen av MX₂ ble også redusert mest ved ko-inkubasjon med ketokonazol (ca 45 %).

Disse funnene var i samsvar med resultater fra forsøk med rekombinante insektmikrosomer transfektert med CYP2D6 og CYP3A4. I forsøk med rekombinante insektmikrosomer var den relative dannelsen av 7HM vesentlig høyere via CYP2D6 enn CYP3A4, mens den relative dannelsen av SM, MX₁ og MX₂ var høyere via CYP3A4 enn via CYP2D6. Totalt sett er det derfor liten tvil om at CYP2D6 relativt sett er viktigere for dannelsen av 7HM enn CYP3A4, mens det motsatte er tilfelle for dannelsen av SM, MX₁ og MX₂ (figur 16). Det er imidlertid et poeng at det i denne oppgaven utelukkende har blitt fokusert på potensiell metabolisme av *N*-dealkylquetiapin via CYP2D6 og CYP3A4. Dette ble gjort fordi modersubstansen quetiapin er vist å være substrat for begge enzymene, men da hovedsakelig

CYP3A4, samt at CYP3A4 og CYP2D6 er de mest sentrale enzymene i omsetning av legemidler generelt. Det kan imidlertid ikke utelukkes at andre enzymer enn CYP3A4 og CYP2D6 er involvert i metabolismen av *N*-dealkylquetiapin, og det vil være aktuelt å undersøke dette nærmere i fremtidige HLM-forsøk med ko-inkubasjon av andre CYP-hemmere, for eksempel CYP2C19, CYP2C9 og CYP1A2.



Figur 15: Antatt hovedinnvolvering av CYP3A4 og CYP2D6 i dannelsen av ulike metabolitter av *N*-dealkylquetiapin basert på *in vitro*-forsøk i oppgaven. 7HM = 7-hydroksy-metabolitt, SM = sulfoksid-metabolitt, MX₁ = uidentifisert metabolitt 1 og MX₂ = uidentifisert metabolitt 2.

4.2 Relativ betydning av CYP2D6 og CYP3A4

For å få et bilde av relativ betydning av CYP2D6 og CYP3A4 i total omsetning/metabolisme av *N*-dealkylquetiapin var det ønskelig å estimere relativ "clearance intrinsic" (CL_{int}) via de to enzymene. Det finnes ulike måter å estimere CL_{int} for enzymkatalysert omdannelse av CYP-substrater på. Den enkleste tilnærmingen er å måle substrattap som funksjon av tid ved inkubasjon med HLM. Da oppnås et estimat på total CYP-mediert clearance av substratet. Dette ble forsøkt i denne oppgaven, men av ukjente årsaker ble substrattapet for lite til å gjøre estimeringer ved standardiserte inkubasjonsbetingelser. En forutsetning for å bruke

substrattap som metode er at minst 20 % av substratet bør forbrukes/tapes i løpet av inkubasjonsperioden for å kunne skille substratet fra mulig støy. Dette krever som oftest bruk av høyere enzymkonsentrasjoner og lenger inkubasjonstid [29]. For å unngå uspesifikk binding av substratet, det vil si "tap" av substrat uten metabolisme, bør imidlertid enzymkonsentrasjonen ikke være for høy. I denne oppgaven ble substrattap av *N*-dealkylquetiapin i HLM med og uten hemmere undersøkt, men forbruket var lavere enn 15 % etter 60 minutters inkubasjon. Det er generelt anbefalt å benytte en enzymkonsentrasjon som ikke er høyere enn 0,5 mg/ml og en inkubasjonstid som ikke er lenger enn 30 minutter på grunn av risiko for uspesifikke bindinger til protein [29]. I oppgaven ble det testet enzymkonsentrasjoner opptil 0,5 mg/ml og inkubasjonstid opptil 60 minutter, men heller ikke dette ga et tap som var høyere enn 15 %. I tillegg ble det testet HLM-preparater fra to ulike leverandører, men begge preparatene viste et substrattap < 20 %. Bruk av substrattap som metode for å estimere relativ CL_{int} av *N*-dealkylquetiapin med og uten ko-inkubasjon med henholdsvis hemmer av CYP2D6 og CYP3A4 ble derfor forkastet.

Estimering av K_m - og V_{max} -verdier ved dannelse av enkeltmetabolitter som funksjon av substratkonsentrasjon er en alternativ metode for å estimere CL_{int} (V_{max}/K_m), men da kun for de enkelte metabolske reaksjonene hver for seg. På grunn av manglende tilgjengelighet av renstoff av metabolitter var det heller ikke mulig å benytte denne metoden for estimering av CL_{int} av *N*-dealkylquetiapin via CYP2D6 og CYP3A4. K_m og V_{max} er imidlertid uavhengige parametere, og det lot seg derfor gjøre å estimere K_m/S_{50} -verdier for den enkelte metabolitt ved HLM-forsøk. Lave K_m/S_{50} -verdier antyder god affinitet til enzym, samt bedre preferanse for dannelse av metabolitt. De laveste K_m/S_{50} -verdiene fra to separate HLM-forsøk ble estimert til ca 100 og 80 μM for 7HM og 120 og 20 μM for SM, mens verdier for MX_2 og MX_1 var adskillig høyere. Dette viser at SM og 7HM har best affinitet til respektive CYP-enzym, noe som kan indikere at disse er hovedmetabolittene av *N*-dealkylquetiapin *in vitro*. Dette er også i tråd med relativ størrelse på de kromatografiske toppene som representerte de ulike metabolittene etter inkubasjon av *N*-dealkylquetiapin med HLM. Som nevnt tidligere viste både forsøk med HLM og rekombinante insektmikrosomer at CYP2D6 er viktig for dannelsen av 7HM, mens CYP3A4 er viktig for dannelsen av SM. Ut i fra dette antas det derfor at K_m/S_{50} -verdien estimert for 7HM er relatert til CYP2D6-mediert metabolisme av *N*-dealkylquetiapin, mens tilsvarende K_m/S_{50} -verdi estimert for SM er relatert til CYP3A4.

Siden CL_{int} ikke lot seg beregne fra forsøk med HLM, ble CL_{int} estimert fra substrattap utført i overuttrykte enzympreparater (insektmikrosomer) med henholdsvis CYP2D6 og CYP3A4. Metabolisme av *N*-dealkylquetiapin via CYP3A4 ga en CL_{int} -verdi på 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{pmol}$, mens CL_{int} -verdien ble estimert til 3 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{pmol}$ via CYP2D6. Ettersom antall enzymer ved inkubasjon var tilnærmet lik i begge mikrosompreparatene (0,85 pmol for CYP3A4 og 0,86 pmol for CYP2D6), indikerer dette at CYP2D6 har høyere katalytisk evne enn CYP3A4 i metabolismen av *N*-dealkylquetiapin *in vitro*. En høyere katalytisk evne av CYP2D6 skyldes trolig at den katalytiske konstanten (k_{cat}) er større for dette enzymet enn CYP3A4. Dette kan antas ut i fra at K_m/S_{50} -verdier estimert i HLM-forsøk for 7HM-dannelse (CYP2D6) var høyere enn dannelsen av SM (CYP3A4), det vil si lavere affinitet av *N*-dealkylquetiapin til CYP2D6 enn CYP3A4. I og med at det var tilnærmet lik mengde enzymer i de rekombinante mikrosomene kan en høyere CL_{int} -verdi via CYP2D6, til tross for høyere K_m -verdi for 7HM enn SM i forsøk med HLM, bety at V_{max} via CYP2D6 må være større enn via CYP3A4. V_{max} bestemmes av antall enzymer (e_0) og den katalytiske konstanten (k_{cat}); ergo tyder alt på at CYP2D6 metaboliserer *N*-dealkylquetiapin mer effektivt enn CYP3A4 *in vitro*.

Det er en utfordring å ekstrapolere til *in vivo* ved bruk av rekombinante mikrosomsystemer, siden CYP-enzymet er overuttrykt i et slikt system i forhold til faktiske forhold i kroppen. I en human gjennomsnittslever er det ca 15 ganger så mye CYP3A4 sammenlignet med CYP2D6 [10]. Siden enzymkonsentrasjonen var tilnærmet lik i de rekombinante mikrosomene anvendt i denne oppgaven, kan forholdet mellom *in vitro* CL_{int} -verdier for CYP3A4 og CYP2D6 justeres med faktor 15 for å få et bilde av relativ betydning *in vivo*. Gitt disse forutsetningene kan det forventes at bidraget av CYP3A4 vil være omtrent 2,5 ganger høyere enn CYP2D6 til total clearance *in vivo* av *N*-dealkylquetiapin. CYP2D6 vil da stå for omtrent 30 %, mens CYP3A4 vil stå for omtrent 70 % av metabolismen av *N*-dealkylquetiapin *in vivo*.

Hvis overnevnte anslag er riktig, vil relativ eksponering av *N*-dealkylquetiapin hos pasienter som er CYP2D6 PM bli 40-50 % høyere sammenlignet med CYP2D6 EM. Tilsvarende økning i eksponering av *N*-dealkylquetiapin kan forventes hos CYP2D6 EM ved kombinert bruk av potente CYP2D6-hemmere (eksempelvis paroxetin eller fluoxetin). Det er vanskelig å avgjøre i hvilken grad dette vil være klinisk relevant, men økt antidepressiv effekt og,

eventuelle bivirkninger kan ikke utelukkes. Dette gjelder spesielt hos de som har dårlig CYP3A4-fenotype, ettersom det relative bidraget av CYP2D6 da vil være høyere enn normalt. Variasjon i CYP3A4-fenotype er som nevnt i innledningen ikke knyttet til genetiske forhold, men det er likevel store interindividuelle variasjoner i uttrykk. Samtidig inntak av legemidler eller stoffer som er potente hemmere eller indukere av CYP3A4 vil kunne påvirke eksponeringen av *N*-dealkylquetiapin og føre til henholdsvis økt eller redusert antidepressiv effekt. Relativ eksponering av *N*-dealkylquetiapin kan forventes å bli 3 ganger så høy ved kombinert bruk av en potent CYP3A4-hemmer.

Usikkerheten i anslagene over bør følges opp med *in vivo*-studier, for å si noe om den faktiske betydningen av CYP2D6 og CYP3A4 i metabolismen av *N*-dealkylquetiapin ved klinisk bruk av quetiapin. Hva slags effekt genmutasjon i CYP2D6 har på serumkonsentrasjonen av *N*-dealkylquetiapin kan undersøkes hos pasienter som behandles med quetiapin og er blitt genotypet for CYP2D6. Betydningen av spesifikke hemmere/indusere av CYP2D6 og/eller CYP3A4 på serumkonsentrasjonen av *N*-dealkylquetiapin kan undersøkes hos pasienter som behandles med quetiapin kombinert med legemidler som er hemmere av CYP2D6 og/ eller CYP3A4. Dette er studier som vil kunne gi svar på betydningen av enzymene i metabolismen av *N*-dealkylquetiapin *in vivo*.

5 KONKLUSJON

Denne oppgaven har dokumentert at både CYP3A4 og CYP2D6 er involvert i metabolismen av *N*-dealkylquetiapin *in vitro*. Videre ble det påvist at CYP2D6 er viktig for dannelsen av 7-hydroksy-metabolitten, mens CYP3A4 er viktig for dannelsen av sulfoksid-metabolitten, samt to metabolitter som ikke lot seg identifisere med sikkerhet. Individuell variasjon i fenotype av CYP3A4 og CYP2D6 kan derfor potensielt få kliniske konsekvenser ved behandling med quetiapin i form av variabel serumkonsentrasjon og dermed antidepressiv respons av den aktive metabolitten *N*-dealkylquetiapin. I hvilken grad genetisk betinget CYP2D6-variasjon, samt kombinert bruk av CYP2D6-hemmere og CYP3A4-hemmere/indusere, innvirker på serumkonsentrasjon av *N*-dealkylquetiapin og eventuell klinisk respons av quetiapin-behandling, må midlertidig undersøkes nærmere i *in vivo*-studier.

LITTERATURLISTE

1. Goodman, L.S., Gilman, A., Brunton, L. L., Lazo, J. S., Parker, K. L., *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 2006, New York: McGraw-Hill. XXIII, 2021 s.
2. Rang, H.P. and M.M. Dale, *Rang and Dale's pharmacology*. 2007, Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier. XIII, 829 s.
3. Nebert, D.W. and D.W. Russell, *Clinical importance of the cytochromes P450*. *Lancet*, 2002. **360**(9340): p. 1155-62.
4. Hamdane, D., Zhang, H., Hollenberg, P., *Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase*. *Photosynth Res*, 2008. **98**(1-3): p. 657-66.
5. Donato, M.T. and J.V. Castell, *Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism: focus on in vitro studies*. *Clin Pharmacokinet*, 2003. **42**(2): p. 153-78.
6. Wilkinson, G.R., *Drug metabolism and variability among patients in drug response*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(21): p. 2211-21.
7. Venkatakrishnan, K., Von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., *Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models*. *J Clin Pharmacol*, 2001. **41**(11): p. 1149-79.
8. Lin, J.H. and A.Y. Lu, *Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. **41**: p. 535-67.
9. Yamaori, S., Yamazaki, H., Suzuki, A., Yamada, A., Tani, H., et al., *Effects of cytochrome b(5) on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(12): p. 2333-40.
10. Paine, M.F., Hart, H. L., Ludington, S. S., Haining, R. L., Rettie, A. E. and D.C. Zeldin, *The human intestinal cytochrome P450 "pie"*. *Drug Metab Dispos*, 2006. **34**(5): p. 880-6.
11. Guengerich, F.P., *Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999. **39**: p. 1-17.
12. Lamba, J.K., Lin, Y. S., Schuetz, E. G., Thummel, K. E., *Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. **54**(10): p. 1271-94.
13. Spurr, N.K., Gough, A. C., Stevenson, K., Wolf, C. R., *The human cytochrome P450 CYP3 locus: assignment to chromosome 7q22-qter*. *Hum Genet*, 1989. **81**(2): p. 171-4.
14. Daly, A.K., *Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms*. *Clin Pharmacokinet*, 2006. **45**(1): p. 13-31.
15. Sim, S.C. <http://www.cypalleles.ki.se>. 28. oktober 2010; Home Page of the human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee].
16. Ingelman-Sundberg, M., *Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future*. *Trends Pharmacol Sci*, 2004. **25**(4): p. 193-200.
17. Zhou, S.F., *Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I*. *Clin Pharmacokinet*, 2009. **48**(11): p. 689-723.
18. Dahl, M.L., *Cytochrome p450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing?* *Clin Pharmacokinet*, 2002. **41**(7): p. 453-70.

19. Neafsey, P., Ginsberg, G., Hattis, D., Sonawane, B., *Genetic polymorphism in cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Population distribution of CYP2D6 activity*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2009. **12**(5-6): p. 334-61.
20. Zanger, U.M., Raimundo, S., Eichelbaum, M., *Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004. **369**(1): p. 23-37.
21. Ma, J.D., Nafziger, A. N., Bertino, J. S., Jr., *Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes and the effect on interindividual, pharmacokinetic variability in extensive metabolizers*. J Clin Pharmacol, 2004. **44**(5): p. 447-56.
22. Kramer, M.A. and T.S. Tracy, *Studying cytochrome P450 kinetics in drug metabolism*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008. **4**(5): p. 591-603.
23. Tracy, T.S. and M.A. Hummel, *Modeling kinetic data from in vitro drug metabolism enzyme experiments*. Drug Metab Rev, 2004. **36**(2): p. 231-42.
24. Houston, J.B., *Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance*. Biochem Pharmacol, 1994. **47**(9): p. 1469-79.
25. Houston, J.B. and K.E. Kenworthy, *In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(3): p. 246-54.
26. Houston, J.B. and A. Galetin, *Modelling atypical CYP3A4 kinetics: principles and pragmatism*. Arch Biochem Biophys, 2005. **433**(2): p. 351-60.
27. Korzekwa, K.R., Krishnamachary, N., Shou, M., Ogai, A., Parise, R. A., et al., *Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites*. Biochemistry, 1998. **37**(12): p. 4137-47.
28. Hutzler, J.M. and T.S. Tracy, *Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(4): p. 355-62.
29. Jones, H.M. and J.B. Houston, *Substrate depletion approach for determining in vitro metabolic clearance: time dependencies in hepatocyte and microsomal incubations*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(9): p. 973-82.
30. Obach, R.S. and A.E. Reed-Hagen, *Measurement of Michaelis constants for cytochrome P450-mediated biotransformation reactions using a substrate depletion approach*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(7): p. 831-7.
31. Obach, R.S., Baxter, J. G., Liston, T. E., Silber, B. M., Jones, B. C., et al., *The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **283**(1): p. 46-58.
32. Hermann, M., Kase, E. T., Molden, E., Christensen, H., *Evaluation of microsomal incubation conditions on CYP3A4-mediated metabolism of cyclosporine A by a statistical experimental design*. Curr Drug Metab, 2006. **7**(3): p. 265-71.
33. Pelkonen, O. and M. Turpeinen, *In vitro-in vivo extrapolation of hepatic clearance: biological tools, scaling factors, model assumptions and correct concentrations*. Xenobiotica, 2007. **37**(10-11): p. 1066-89.
34. Brandon, E.F., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H., Schellens, J. H., *An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons*. Toxicol Appl Pharmacol, 2003. **189**(3): p. 233-46.
35. Hewitt, N.J., Lechon, M. J., Houston, J. B., Hallifax, D., Brown, H. S., et al., *Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies*. Drug Metab Rev, 2007. **39**(1): p. 159-234.

36. Loretz, L.J., Li, A. P., Flye, M. W., Wilson, A. G., *Optimization of cryopreservation procedures for rat and human hepatocytes*. Xenobiotica, 1989. **19**(5): p. 489-98.
37. Roymans, D., Annaert, P., Van Houdt, J., Weygers, A., Noukens, J., et al., *Expression and induction potential of cytochromes P450 in human cryopreserved hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(7): p. 1004-16.
38. Chen, Y., Monshouwer, M., Fitch, W. L., *Analytical tools and approaches for metabolite identification in early drug discovery*. Pharm Res, 2007. **24**(2): p. 248-57.
39. Sauvage, F.L., Picard, N., Saint-Marcoux, F., Gaulier, J. M., Lachatre, G. and P. Marquet, *General unknown screening procedure for the characterization of human drug metabolites in forensic toxicology: applications and constraints*. J Sep Sci, 2009. **32**(18): p. 3074-83.
40. Holcapek, M., Kolarova, L., Nobilis, M., *High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites*. Anal Bioanal Chem, 2008. **391**(1): p. 59-78.
41. Tolonen, A., Turpeinen, M., Pelkonen, O., *Liquid chromatography-mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening*. Drug Discov Today, 2009. **14**(3-4): p. 120-33.
42. Youdim, K.A. and K.C. Saunders, *A review of LC-MS techniques and high-throughput approaches used to investigate drug metabolism by cytochrome P450s*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010. **878**(17-18): p. 1326-36.
43. Liu, D.Q. and C.E. Hop, *Strategies for characterization of drug metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization and on-line H/D exchange approaches*. J Pharm Biomed Anal, 2005. **37**(1): p. 1-18.
44. Jensen, N.H., Rodriguiz, R. M., Caron, M. G., Wetsel, W. C., Rothman, R. B., and B.L. Roth, *N-desalkylquetiapine, a potent norepinephrine reuptake inhibitor and partial 5-HT_{1A} agonist, as a putative mediator of quetiapine's antidepressant activity*. Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(10): p. 2303-12.
45. Castberg, I., Skogvoll, E., Spigset, O., *Quetiapine and drug interactions: evidence from a routine therapeutic drug monitoring service*. J Clin Psychiatry, 2007. **68**(10): p. 1540-5.
46. DeVane, C.L. and C.B. Nemeroff, *Clinical pharmacokinetics of quetiapine: an atypical antipsychotic*. Clin Pharmacokinet, 2001. **40**(7): p. 509-22.
47. McIntyre, R.S., Soczynska, J. K., Woldeyohannes, H. O., Alsuwaidan, M., Konarski, J. Z., *A preclinical and clinical rationale for quetiapine in mood syndromes*. Expert Opin Pharmacother, 2007. **8**(9): p. 1211-9.
48. Winter, H.R., Earley, W. R., Hamer-Maansson, J. E., Davis, P. C., Smith, M. A., *Steady-state pharmacokinetic, safety, and tolerability profiles of quetiapine, norquetiapine, and other quetiapine metabolites in pediatric and adult patients with psychotic disorders*. J Child Adolesc Psychopharmacol, 2008. **18**(1): p. 81-98.
49. Hasselstrom, J. and K. Linnet, *In vitro studies on quetiapine metabolism using the substrate depletion approach with focus on drug-drug interactions*. Drug Metabol Drug Interact., 2006. **21**(3-4): p. 187-211.
50. Grimm, S.W., Richtand, N. M, Winter, H. R, Stams, K. R, Reece, S. B., *Effects of cytochrome P450 3A modulators ketoconazole and carbamazepine on quetiapine pharmacokinetics*. Br J Clin Pharmacol, 2006. **61**(1): p. 58-69.
51. Mauri, M.C., Volonteri, L. S., Colasanti, A., Fiorentini, A., De Gaspari, I. F. and S.R. Bareggi, *Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics: a critical review of the relationship between plasma concentrations and clinical response*. Clin Pharmacokinet, 2007. **46**(5): p. 359-88.

52. Bakken, G.V., Rudberg, I., Christensen, H., Molden, E., Refsum, H., Hermann, M., *Metabolism of quetiapine by CYP3A4 and CYP3A5 in presence or absence of cytochrome B5*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(2): p. 254-8.
53. Lin, S.N., Chang, Y., Moody, D. E., Foltz, R. L., *A liquid chromatographic-electrospray-tandem mass spectrometric method for quantitation of quetiapine in human plasma and liver microsomes: application to study in vitro metabolism*. J Anal Toxicol., 2004. **28**(6): p. 443-8.
54. Calabrese, J.R., Keck, P. E., Jr., Macfadden, W., Minkwitz, M., Ketter, T. A., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of quetiapine in the treatment of bipolar I or II depression*. Am J Psychiatry, 2005. **162**(7): p. 1351-60.
55. Thase, M.E., Macfadden, W., Weisler, R. H., Chang, W., Paulsson, B., A. Khan, and J.R. Calabrese, *Efficacy of quetiapine monotherapy in bipolar I and II depression: a double-blind, placebo-controlled study (the BOLDER II study)*. J Clin Psychopharmacol, 2006. **26**(6): p. 600-9.
56. Bogart, G.T. and B. Chavez, *Safety and efficacy of quetiapine in bipolar depression*. Ann Pharmacother, 2009. **43**(11): p. 1848-56.
57. Bauer, M., Pretorius, H. W., Constant, E. L., Earley, W. R., Szamosi, J. and M. Brecher, *Extended-release quetiapine as adjunct to an antidepressant in patients with major depressive disorder: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind study*. J Clin Psychiatry, 2009. **70**(4): p. 540-9.
58. AstaZeneca. <http://www.seroquelxr.com>. 2010.
59. Felleskatalogen. 2010.
60. Goldstein, J.M., Grimm, S., Christoph, G., Liu, J.W., Widzowski, D., Brecher, M., *Unique mechanism of action for the antidepressant properties of the atypical antipsychotic quetiapine*. The Society of Biological Psychiatry's 62nd Annual Convention & Scientific Program. 2007, San Diego, CA, USA.
61. Bakken, G.V., Rudberg, I., Molden, E., Refsum, H., Hermann, M., *Pharmacokinetic variability of quetiapine and the active metabolite N-desalkylquetiapine in psychiatric patients*
Manuscript submitted October 2010